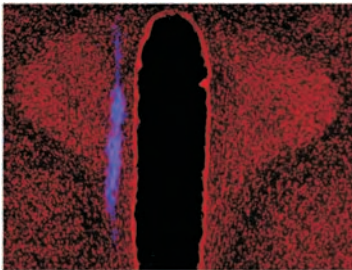
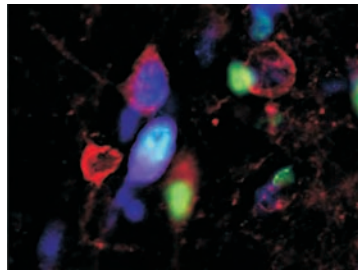


**Der Nucleus praeopticus medianus im
Hypothalamus der Ratte als prä-integrative
Struktur afferenter Signale zur Aufrecht-
erhaltung des Salz- und Wasserhaushaltes
sowie der Körperkerntemperatur**

Tanja Weber



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

**Der *Nucleus praeopticus medianus* im Hypothalamus der Ratte als
prä-integrative Struktur afferenter Signale zur Aufrechterhaltung
des Salz- und Wasserhaushaltes sowie der Körperkerntemperatur**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Dr.med.vet.
beim Fachbereich der Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

eingereicht von

Tanja Weber

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen, 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs für Veterinärmedizin
der Justus-Liebig- Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Tag der Disputation: 13.02.2009

Meinen Eltern N. und W. Weber

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | a-h |
| Abkürzungen | I-V |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Homöostase und Hypothalamus | 1 |
| 1.2 Die <i>Lamina terminalis</i> | 2 |
| 1.3 Homöostase des Wasser-und Elektrolythaushaltes | 8 |
| 1.3.1. Zentrale Osmorezeptoren/zentrale Osmosensitivität | 9 |
| 1.3.2. Periphere Osmorezeptoren | 14 |
| 1.3.3. Periphere Volumenrezeptoren | 15 |
| 1.3.4. MnPO und efferente Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes | 16 |
| 1.3.5. „IEG-Mapping“ nach osmotischer und Volumenstimulation | 18 |
| 1.4. Homöostase der Körperkerntemperatur | 20 |
| 1.4.1. Periphere Thermorezeptoren und afferente Signaltransduktion | 21 |
| 1.4.2. Zentrale Thermorezeptoren/zentrale Thermosensitivität | 23 |
| 1.4.3. „IEG-Mapping“ nach Wärmeexposition | 24 |
| 1.4.4. Präoptische Region (inkl.MnPO) und efferente Kontrolle des Wärmehaushaltes | 25 |
| 1.4.4.1. Wärmebildungsmechanismen | 25 |
| 1.4.4.2. Wärmeabgabemechanismen | 26 |
| 1.5 Das nitrerge System des MnPO und der <i>Lamina terminalis</i> | 29 |
| 1.5.1. Bedeutung des hypothalamischen NO für die Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes | 32 |

| | |
|---|---------------|
| 1.5.2. Bedeutung des hypothalamischen NO für die Homöostase der Körperkerntemperatur | 35 |
| 1.6 Das noradrenerge System des MnPO und der <i>Lamina terminalis</i> | 37 |
| 1.7 Das intracerebrale Renin-Angiotensin System (RAS) | 40 |
| 1.8 Ziele der wissenschaftlichen Arbeit | 45 |
| 2. Material und Methoden | 47 |
| 2.1 Material | 47 |
| 2.1.1. Geräte | 47 |
| 2.1.2. Gebrauchsmaterial | 48 |
| 2.1.3. Verbrauchsmaterial | 49 |
| 2.1.4. Chemikalien | 50 |
| 2.2 Versuchstiere | 52 |
| 2.3 Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer | 53 |
| 2.3.1. Lösungen für die Immunhistochemie | 53 |
| 2.3.1.1. Phosphatpuffer (PB) | 53 |
| 2.3.1.2. Präinkubationspuffer für die Immunhistochemie | 53 |
| 2.3.1.3. Inkubationspuffer für immunhistochemische Untersuchungen | 53 |
| 2.3.1.4. Avidin-Biotin-Blocking Kit | 54 |
| 2.3.1.5. Paraformaldehydlösung (PFA 4 %) | 54 |
| 2.3.1.6. Physiologische Kochsalzlösung | 54 |
| 2.3.1.7. Saccharoselösung (20 %) | 54 |
| 2.3.1.8. Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1.9. Waschpuffer für immunzytochemische Untersuchungen | 55 |
| 2.3.2. Lösungen zur Zellkulturpräparation | 55 |
| 2.3.2.1. Neurobasal-Medium A | 55 |
| 2.3.2.2. Gey's Balanced Salt Solution (GBSS) | 55 |
| 2.3.2.3. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) | 55 |
| 2.3.2.4. Ansetzen der Dispaselösung | 56 |
| 2.3.2.5. Inaktivierungslösung der Dispase | 56 |
| 2.3.3. Lösungen für Ratio - Imaging Messungen | 56 |
| 2.3.3.1. Calciummesspuffer | 56 |
| 2.4 Methoden | 56 |
| 2.4.1. Telemetrie | 56 |
| 2.4.1.1. Der Sender | 56 |
| 2.4.1.2. Vorbereitung des Senders | 57 |
| 2.4.1.3. Implantation des Senders | 57 |
| 2.4.1.4. Umsetzen der Versuchstiere in den telemetrischen Versuchsraum | 57 |
| 2.4.1.5. Auswertung der telemetrischen Daten | 59 |
| 2.4.2. Versuchsansätze | 60 |
| 2.4.3. Bestimmung der Blutparameter | 62 |
| 2.4.3.1. Hämatokritwert | 62 |
| 2.4.3.2. Plasma- Na^+ -Konzentration | 62 |
| 2.4.3.3. Plasmaosmolalität | 63 |
| 2.4.3.4. Auswertung der Blutparameter | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.4. Neuronales retrogrades Tracing | 64 |
| 2.4.4.1. Stereotaktische Operationseinheit und –technik | 64 |
| 2.4.5. Immunhistochemie | 66 |
| 2.4.5.1. Grundlagen der Immunhistochemie/-zytochemie | 66 |
| 2.4.5.2. Indirekte Immunfluoreszenz | 68 |
| 2.4.5.3. Perfusion | 70 |
| 2.4.5.4. Präparation des Gehirns und Anfertigung der Gefrier-Schnitte | 71 |
| 2.4.5.5. Gelatine-Beschichtung der Objektträger | 72 |
| 2.4.5.6. Protokoll des indirekten Immunfluoreszenznachweises für die zelluläre Expression von nNOS/Fos sowie des α_1 -Adrenozeptors | 72 |
| 2.4.5.7. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen | 73 |
| 2.4.6. Primäre Zellkultur des MnPO der Ratte | 76 |
| 2.4.6.1. Vorbereitung der Zellkulturkammern | 76 |
| 2.4.6.2. Präparation des <i>Nucleus medianus preopticus</i> | 77 |
| 2.4.7. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Ratio-Imaging Technik | 78 |
| 2.4.7.1. Grundlagen der Ratio-Imaging Technik | 78 |
| 2.4.7.2. Der Einsatz von Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester in der Primärkultur | 81 |
| 2.4.8. Der Messtand für die Calcium-Imaging Versuche | 82 |
| 2.4.9. Vorbereitung der Versuchsdurchführung | 84 |
| 2.4.10. Versuchsdurchführung | 84 |
| 2.4.10.1. Messprotokolle für das Ratio-Imaging | 84 |

| | |
|---|------------|
| 2.4.10.2. Versuchsserie I | 86 |
| 2.4.10.3. Versuchsserie II | 87 |
| 2.4.10.4. Immunzytochemie an der Primärzellkultur des MnPO zum Nachweis zelltypspezifischer Marker, Enzyme und Rezeptoren | 87 |
| 2.4.10.5. Auswertung der Ratio-Imaging Untersuchungen | 88 |
| 3. Ergebnisse | 91 |
| 3.1. Physiologische Ganztierversuche | 91 |
| 3.1.1. Telemetrie Versuchsgruppe A: Thermische Stimulation | 91 |
| 3.1.1.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur | 91 |
| 3.1.1.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität | 94 |
| 3.1.1.3. Zeitlicher Verlauf der Trinkwasseraufnahme | 97 |
| 3.1.2. Telemetrie Versuchsgruppe B: Hitzestress | 100 |
| 3.1.2.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur | 100 |
| 3.1.2.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität | 103 |
| 3.1.2.3. Zeitlicher Verlauf der Trinkwasseraufnahme | 106 |
| 3.1.3. Telemetrie Versuchsgruppe C: Isotone Hypovolämie | 110 |
| 3.1.3.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur | 110 |
| 3.1.3.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität | 111 |
| 3.1.4. Telemetrie Versuchsgruppe D: Osmotische Stimulation | 113 |
| 3.1.4.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur | 113 |
| 3.1.4.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität | 116 |
| 3.1.5 Einfluss der thermischen, osmotischen und Volumen- Stimulationen auf das EZF-Kompartiment | 119 |
| 3.1.5.1. Hämatokritwert | 119 |
| 3.1.5.2. Plasmaosmolalität und –Natriumkonzentration | |

| | |
|---|------------|
| 3.1.6. Abschließende Betrachtung der telemetrischen | |
| Untersuchungen | 124 |
| 3.2. Thermische, osmo- und volumenregulatorische Aktivierung | |
| hypothalamischer Neurone | 126 |
| 3.2.1. Quantitative Analyse induzierter neuronaler Fos-Translokation | |
| im <i>Nucleus praeopticus medianus</i> | 126 |
| 3.2.1.1. Anteriorer <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 126 |
| 3.2.1.2. Dorsaler <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 128 |
| 3.2.1.3. Ventraler <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 128 |
| 3.2.2. Neuronale Aktivierungsmuster im <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 129 |
| 3.2.3. Aktivierung nNOS-positiver Neurone im MnPO | 132 |
| 3.2.3.1. Anteriorer <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 134 |
| 3.2.3.2. Dorsaler <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 135 |
| 3.2.3.3. Ventraler <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 137 |
| 3.2.4. Aktivierung (nicht-)nitrerger Neurone im OVLT | 142 |
| 3.2.4.1. Verteilung und Quantifizierung nukleärer Fos-Signale | 142 |
| 3.2.4.2. Aktivierung nitrerger OVLT-Neurone | 145 |
| 3.3. Retrogrades, neuronales Tracing afferenter, monosynaptischer | |
| Verbindungen zum pPVN | 146 |
| 3.3.1. (Extra-)hypothalamische neurogliale Strukturen mit efferenter | |
| Projektion zum pPVN | 146 |
| 3.3.2. Immunhistochemische Charakterisierung getracter Neurone in | |
| MnPO und OVLT nach osmotischer Stimulation | 155 |
| 3.3.2.1. Anteriorer <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 156 |
| 3.3.2.2. Dorsaler <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 157 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.2.3. Ventraler <i>Nucleus praepoticus medianus</i> | 159 |
| 3.3.2.4. <i>Organum vasculosum laminae terminalis</i> | 160 |
| 3.4 Transmitter-induzierte Signaltransduktion in Neuronen und Astrozyten der MnPO-Primärkultur | 162 |
| 3.4.1. Calciumabhängige Signaltransduktion in Neuronen der MnPO angereicherten Primärkultur | 162 |
| 3.4.2. Calciumabhängige Signaltransduktion in Astrozyten der MnPO angereicherten Primärkultur | 167 |
| 3.4.3. Charakterisierung des in Neuronen und Astrozyten der MnPO Primärkultur exprimierten Adrenozeptor-Subtyps | 169 |
| 3.4.3.1. Funktionelle Charakterisierung in der MnPO-Primärkultur | 169 |
| 3.4.3.2. Immunzytochemischer Nachweis des α_1 -Adrenozeptors in MnPO-Zellen | 178 |
| 3.4.4. AngII responsive, nNOS-exprimierende Neurone in der MnPO-Primärkultur | 181 |
| 4. Diskussion | 183 |
| 4.1. Neuronale Aktivierung in MnPO-Substrukturen nach Wärme Exposition, Dehydrierung und Hypovolämie | 183 |
| 4.2. Aktivierung nitrerger Neurone in den Substrukturen des MnPO nach Wärmeexposition, Dehydrierung und Hypovolämie | 188 |
| 4.3. Aktivierung nitrerger Neurone nach Dehydrierung in den Substrukturen des MnPO mit efferenter neuraler Projektion | 191 |
| 4.4. Calciumabhängige intrazelluläre Signaltransduktion durch AngII und NA in Neuronen/Astrozyten des MnPO | 195 |
| 4.4.1. Calcium als intrazellulärer Botenstoff | 195 |
| 4.4.2. AngII-induzierte Calciumsignale | 196 |
| 4.4.3. Noradrenalin-induzierte Calciumsignale | 199 |
| 4.4.4. Antworttypen der AngII-, NA- bzw. PHE-induzierten Calciumsignale bei Neuronen und Astrozyten | 201 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.5. Immunzytochemische Charakterisierung NA- und AngII-responsiver Neurone | 202 |
| 5. Zusammenfassung | 206 |
| Summary | 211 |
| Literaturverzeichnis | 216 |
| Erklärung | 246 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| 1-Std-MW | 1-Stunden-Mittelwert |
| 6-Std-MW | 6-Stunden-Mittelwert |
| Abb. | Abbildung |
| ac | activity counts |
| ac | <i>Commissura anterior</i> |
| AcB | <i>Nucleus accumbens</i> |
| aCSF | artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit |
| Ag | Antigen |
| Ak | Antikörper |
| al. | <i>alter</i> |
| aMnPO | anteriorer Anteil des MnPO |
| AngII | Angiotensin II |
| AP | <i>Area postrema</i> |
| ARW | Anregungswellenlänge |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AV3V | anterio-ventrale Region des dritten Ventrikels |
| AVP | Vasopressin |
| BAT | braunes Fettgewebe |
| BH4 | Tetrahydrobiopterin |
| BHS | Blut-Hirn Schranke |
| bzw. | beziehungsweise |
| Ca | Calcium |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CCD | charge-coupled device |
| Cg | <i>Cingulum</i> |
| cGMP | cyclisches Guanosinmonophosphat |
| ChAT | Cholinacetyltransferase |
| cm | Zentimeter |
| CVO | circumventrikuläre Organe |
| Cy ₃ | Carboxymethylindocyanin |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DC | dorsal cap |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| DeN | <i>Nucleus endopiriformis dorsalis</i> |
| DMH | dorsomedialer Hypothalamus |
| dMnPO | dorsaler Anteil des MnPO |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraessigsäure |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| etc. | <i>et cetera</i> |
| EZF | extrazelluläre Flüssigkeit |
| EZK | extrazelluläre Körperflüssigkeit |
| F _{ab} | fragment antigen binding |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| F _c | fragment crystallizable |
| Fe ²⁺ | Eisen-II- |
| Fe ³⁺ | Eisen-III- |
| FMN | Flavin-Adenin-Mononucleotid |
| Fos-IR | Fos immunoreaktiv |
| Fura-2-AM | Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester |
| g | Gramm |
| GABA | γ-Aminobuttersäure |
| GBSS | Gey's Balanced Salt Solution |
| GFAP | glial fibrillary acidic protein |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GPCR | G-Protein gekoppelter Rezeptor |
| Glu | Glutamat |
| GTP | Guanosin-Triphosphat |
| h | Stunde |
| HÄM | Eisen-Protoporphyrin |
| HBSS | Hanks Balanced Salt Solution |
| HDB | diagonales Band von Broca, horizontaler Schenkel |
| Hg | Quecksilber |
| Hkt | Hämatokrit |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| icv | intracerebroventrikulär |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| IE | internationale Einheit |
| IEG | immediate early gene |
| IgG | Immunglobulin G |
| IP ₃ | Inositoltriphosphat |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| i.p. | intraperitoneal |
| JGA | juxtaglomerulärer Apparat |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kg | Kilogramm |
| KT | Körperkerntemperatur |
| l | Liter |
| LA | <i>Nucleus hypothalamicus lateroanterioris</i> |
| LHA | laterales hypothalamisches Areal |
| L-NAME | N-Nitro-L-Arginin Methylester |
| LPBN | <i>Nucleus parabrachialis lateralis</i> |
| LPO | laterale präoptische Region |
| LS | <i>Septum lateralis</i> |
| LSD | <i>Septum lateralis dorsalis</i> |
| LSI | <i>Septum lateralis intermedialis</i> |
| LSV | <i>Septum lateralis ventralis</i> |
| M | Mol |
| MAP | mittlerer arterieller Blutdruck |
| MAP 2a+b | microtubuli-associated protein 2a+b |
| MCN | magnozelluläre neurosekretorische Neurone |
| MeAD | <i>Nucleus amygdalis medialis anterodorsalis</i> |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| MnPO | <i>Nucleus medianus praeopticus</i> |
| mosm | Milliosmol |
| MPA | mediale präoptische Region |
| MPO | <i>Nucleus praeropticus medialis</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|---|
| MPOC | <i>Nucleus praeopticus medialis centralis</i> |
| MPOM | <i>Nucleus praeopticus medialis medialis</i> |
| MPOL | <i>Nucleus praeopticus medialis lateralis</i> |
| ms | Millisekunde |
| MS | <i>Nucleus septalis medialis</i> |
| MW | Mittelwert |
| NA | Noradrenalin |
| Na | Natrium |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogen-Phosphat |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogen-Phosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| NHS | normal horse serum |
| nm | Nanometer |
| NMDA | N-Methyl-D- <u>Aspartat</u> |
| nNOS | neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| nl | Nanoliter |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NTS | <i>Nucleus tractus solitarius</i> |
| OT | Objektträger |
| OVLT | <i>Organum vasculosum laminae terminalis</i> |
| PAG | zentrales Höhlengrau |
| PB | Phosphatpuffer |
| PDZ | PSD-95 discs large/ZO-1homology domain |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHA-L | <i>Phaseolus vulgaris</i> -Lektin |
| PHE | Phenylephrin |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| POA | präoptische Region |
| PSD-93 | postsynaptic density protein 93 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| PSD-95 | postsynaptic density protein 95 |
| Praz | Prazosin |
| PVA | <i>Nucleus paraventricularis thalami</i> |
| PVN | <i>Nucleus paraventricularis hypothalami</i> |
| RAS | Renin-Angiotensin-System |
| RITC | Rhodamin-Isothiocyanat |
| ROI | region of interest |
| RP | Regierungspräsidium |
| RSNA | renale sympathische Nervenaktivität |
| RT | Raumtemperatur |
| SCh | <i>Nucleus suprachiasmaticus</i> |
| sec | Sekunde |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SFO | Subfornikalorgan, <i>Organum subfornicale</i> |
| SIC | “stretch inactivated” ionic channels |
| SNAP | S-Nitroso-N-Acetyl Penicillamin |
| SON | <i>Nucleus supraopticus</i> |
| TRPV | transient receptor potential vanilloid |
| u.a. | unter anderem |
| UPM | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| v.a. | vor allem |
| VDB | diagonales Band von Broca, vertikaler Schenkel |
| VLPO | ventrolaterale präoptische Region |
| VMPO | ventromediale präoptische Region |
| vMnPO | ventraler Anteil des MnPO |
| Vol. | Volumen |
| VTA | ventrales <i>Tegmentum</i> |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

1.1. Homöostase und Hypothalamus

Die Bedeutung des „Milieu interieur“ für die Aufrechterhaltung des Lebens wurde erstmals von dem Physiologen Claude Bernard (1865) beschrieben und liegt darin begründet, dass die Regelgrößen des „Milieu interieur“ eines tierischen Organismus in einem Zustand des Fließgleichgewichts gehalten werden, welcher auch als „Homöostase“ bezeichnet wird. Der Begriff „Homöostase“ ist von dem griechischen Wort *homoios* für „gleichartig, ähnlich“ abgeleitet und wird durch ein komplexes Aufeinanderabstimmen afferenter Signalübertragung und efferent modulierter Kontrollmechanismen im Rahmen autonomer Regelkreise ermöglicht.

Der Hypothalamus des *Diencephalon* gilt als übergeordnetes Kontrollzentrum autonomer Regelkreise und repräsentiert somit das wichtigste zentralnervöse Integrationszentrum für die Regulation homöostatischer Systeme. In seinen neuroglialen Strukturen erfolgt die Perzeption und Integration afferenter Signale im Zusammenhang mit der Konstanthaltung der Nahrungsaufnahme (Leibowitz & Brown, 1980), der circadianen Rhythmik (Aschoff, 1990), des Blutkreislaufs (Coote, 1995), der Körpertemperatur (Simon *et al.*, 1986) sowie des Wasser- und Elektrolythaushaltes (Andersson, 1978) (Abb. 1). Vereinfacht dargestellt vergleicht der Hypothalamus physiologische und pathophysiologische Abweichungen der zu regelnden, physiologischen Größen (Istwerte) mit vorgegebenen Sollwerten. Nach neuronaler Integration zahlreicher afferenter Signale moduliert er die Aktivität bestimmter peripherer Effektororgane, die durch Anpassung an den vorgegebenen Sollwert einen neuen Istwert einstellen. Entspricht der Istwert dem geforderten Sollwert, so ist das innere Fließgleichgewicht wieder hergestellt.

1.2. Die *Lamina terminalis*

Sowohl hinsichtlich der Perzeption als auch Integration osmo-, volumen- und temperatur-relevanter Signale übernehmen besonders neurogliale Kerngebiete,

die in der *Lamina terminalis* des rostralen Hypothalamus lokalisiert sind, eine wichtige Funktion (McKinley *et al.*, 1999). Die *Lamina terminalis* entsteht während der frühen embryonalen Entwicklung des Vertebratengehirns als Spezialisierung ependymaler Zellen und bildet schließlich die anteriore Wand des dritten Hirnventrikels (Johnson & Thunhorst, 1997). In ihr sind neurogliale Strukturen wie das Subfornikalorgan (SFO) und das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) lokalisiert, die zu den circumventrikulären Organen (CVOs) gehören. CVOs bilden im Gegensatz zu allen anderen Regionen des ZNS keine dichte Blut-Hirn Schranke (BHS) aus. Für das Säugergehirn sind sieben CVOs klassifiziert worden (Hofer, 1958): Die bereits genannten SFO und OVLT, die Epiphyse (= Pinealorgan), die *Eminentia mediana*, die Neurohypophyse, die *Area postrema* (AP) und das *Organum subcommissurale* (SCO) (Abb. 2). Die CVOs befinden sich in unmittelbarer Nähe zum dritten (SFO, OVLT, Pinealorgan, *Eminentia mediana*, Neurohypophyse und SCO) bzw. vierten Hirnventrikel (*Area postrema*) (Leonhardt *et al.*, 1975; McKinley *et al.*, 2004).

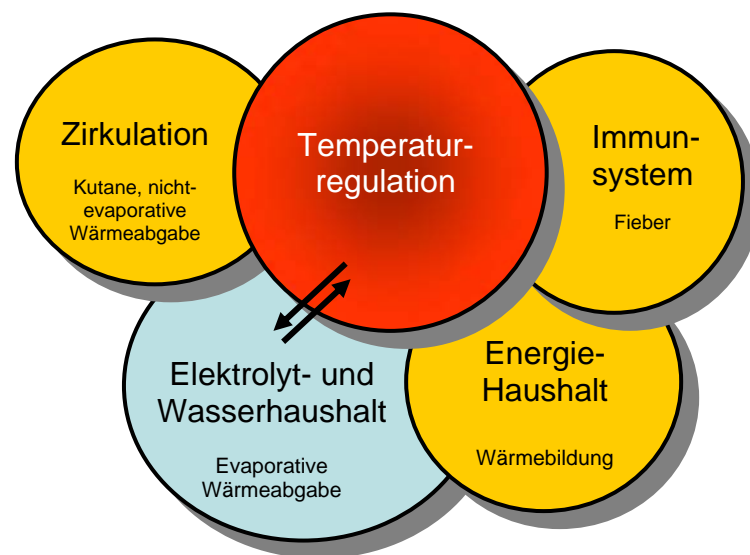


Abb. 1: Hypothalamische Interaktion wichtiger homöostatischer Regelkreise

Die durch den Hypothalamus kontrollierten, homöostatischen Regelsysteme etwa zur Konstanthaltung des Kreislaufs, der Körperkerntemperatur, des Elektrolyt-/Wasserhaushaltes und des Energiehaushaltes, sowie des Immunsystems, sind untereinander neuronal vermascht. Wird die Homöostase eines dieser Regelsysteme gestört, so beeinflusst dies unweigerlich andere. Beispielsweise bedingt eine erhöhte evaporative Wärmeabgabe eine Hypovolämie der extrazellulären Körperflüssigkeit. Temperaturregulation und der Elektrolyt-/Wasserhaushalt stehen in einer archaischen, besonders engen Verbindung zueinander (*Pfeile*).

Morphologisch ähneln die Kapillaren der stark vaskularisierten CVOs mit lecken Zell-zu-Zell Kontakten und großen perivaskulären Räumen den fenestrierten Endothelien zahlreicher peripherer Organe wie Darm oder Niere. Der enge Kontakt zu Astrozyten, deren Ausläufer in anderen Gehirnregionen die Basallamina der Endothelzellen bedecken und untereinander durch gap junctions verbunden sind, fehlt im Bereich der CVOs (Betz *et al.*, 1989). Morphologische Ähnlichkeiten auf zellulärer Ebene finden sich in einer CVO-Untergruppe, die als sensorische CVOs bezeichnet werden (Roth *et al.*, 2004; Simon, 2000). Hierbei handelt es sich um das OVLT, das SFO und die AP, die nicht nur Gliazellen sowie Axone projizierender Neurone, sondern auch neuronale Zellkörper mit efferenter Projektion in andere Hirnareale enthalten. Diese morphologischen Spezialisierungen ermöglichen im Blut zirkulierenden Substanzen die direkte Modulation neuronaler Zellen ausschließlich im Bereich der sensorischen CVOs der *Lamina terminalis* und der AP, weshalb diese speziell als rezeptive Strukturen für humorale Botenstoffe gelten. Zirkulierende Signalmoleküle aktivieren somit Rezeptor-vermittelt CVO-intrinsische Neurone oder induzieren lokal die Produktion weiterer Mediatoren (Roth *et al.*, 2004). Ausführliche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des OVLT und des SFO wurden bei verschiedenen Spezies einschließlich der Ratte durchgeführt (McKinley & Johnson, 2004; Weisinger *et al.*, 1990).

Die Integration sowohl der in diesen sensorischen Kerngebieten perzipierten humoralen Informationen als auch afferenter neuronaler Signale aus (extra-) hypothalamischen Strukturen erfolgt zum einen in den parvozellulären Anteilen des *Nucleus paraventricularis* (PVN), zum anderen in einem in der *Lamina terminalis* lokalisierten Kerngebiet, dem *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO), der im Gegensatz zu den CVOs jedoch innerhalb der BHS gelegen ist (Abb. 2). Den Funktionen der *Lamina terminalis* und den in ihr befindlichen CVOs inklusive der zentralen Verarbeitung der perzipierten sensorischer Information über neuronale Konnektivitäten wird schon seit längerer Zeit großes Interesse entgegengebracht. Dabei ist die Bedeutung des MnPO als integrativer Relaisstation Gegenstand intensiver Forschung (Johnson & Thunhorst, 1997; Kolaj & Renaud, 2001). Zytoarchitektonisch wird der MnPO in einen dorsalen (dMnPO) und einen ventralen (vMnPO) Anteil eingeteilt, basierend auf der relativen Loka-

lisation zur *Commissura anterior* (CA) (Paxinos, 1986). Die rostrale, die CA umfassende Verbindung dieser beiden Anteile ist in coronalen Gehirnschnitten deutlich zu erkennen und wird als anteriorer MnPO (aMnPO) definiert. In Nissl-gefärbten Sagittal-Schnitten des Rattengehirns erstreckt sich der MnPO von rostral des vertikalen Schenkels des diagonalen Bandes von Broca bis zum Beginn des dritten Ventrikels. Die ventrale Begrenzung bildet das OVLT, die dorsale das Faserbündel der *Fornix* mit juxtapositioniertem SFO. Der aMnPO besteht aus einer kompakten Gruppe von kleinzelligen Neuronen mit einem mittleren Zelldurchmesser von 14 μm . Der dMnPO umfasst eine dimorphe Population locker gepackter Nervenzellen mit Durchmessern der Perikaryen von 8 bis 20 μm . Der vMnPO weist in seinem anterioren Part locker gepackte, im Durchschnitt 19 μm große Neurone auf, während weiter posterior die Neuronenpopulationen dichter und weniger polymorph erscheinen (Johnson *et al.*, 1992).

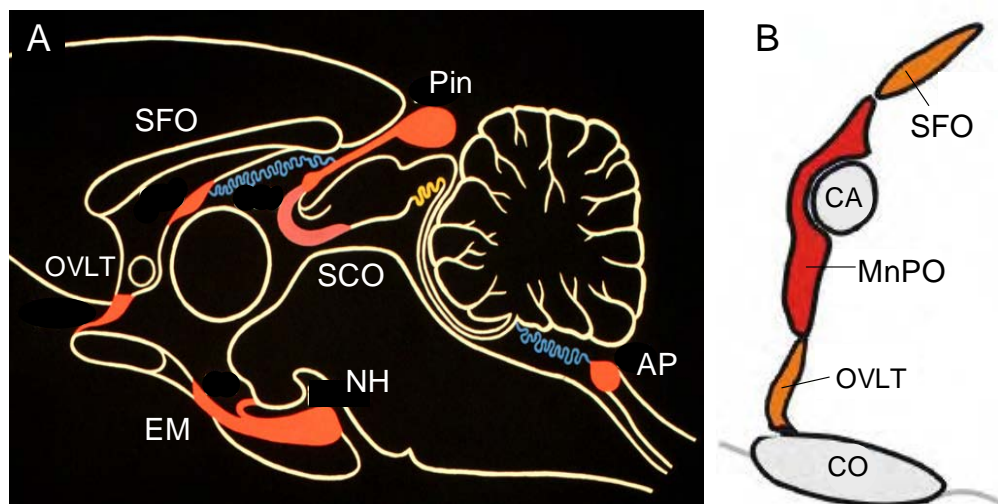


Abb. 2: Schematische, sagittale Darstellung der Lokalisation circumventrikulärer Organe und der *Lamina terminalis* des Rattengehirns

Im Gehirn der Ratte lassen sich sieben circumventrikuläre Organstrukturen (CVOs) (orange) ohne ausgeprägte Blut-Hirn Schranke (BHS) nachweisen [A]. In der den anterioren Hypothalamus begrenzenden *Lamina terminalis* [B] findet sich neben zwei sensorischen CVOs auch der innerhalb der BHS gelegene *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO), der als neuronale Relaisstation im Rahmen der Thermo- und Osmoregulation fungiert.

AP: Area postrema, CA: Commissura anterior, CO: Chiasma opticum, EM: Eminentia mediana, NH: Neurohypophyse, OVLT: Organum vasculosum laminae terminalis, Pin: Pinealorgan, SCO: Organum subcommissurale, SFO: Organum subfornicale

Frühe neuronale Degenerationsstudien bei der Ratte wiesen darauf hin, dass Neurone des MnPO sowohl zum SFO als auch zum OVLT projizieren (Hernesniemi *et al.*, 1972). Diese Studien umfassten Mikroinjektionen des retrograden Tracers Meerrettichperoxidase (HRP) in den PVN (Ljungdahl *et al.*, 1975; Silverman *et al.*, 1981), den MnPO und das OVLT. HRP gilt als die erste, bereits in den 1970er Jahren in der Literatur beschriebene retrograde neuronale Tracersubstanz (LaVail & LaVail, 1972). Die Mikroinjektion anterograd oder retrograd axonal transportierter Tracermoleküle in neuronale Kerngebiete bzw. Ansammlungen von Axonendigungen stellt eine wichtige Standardmethode zur histologischen Darstellung einzelner Neurone bzw. Neuronenverbände und deren axonale Projektionsmuster dar. Anterograder Transport markiert Nervenfasern und -endigungen, retrograder Transport Zellkörper (Chi *et al.*, 2007). Grundsätzlich wird zwischen schnellen und langsamen axonalen Transportsystemen unterschieden. Über den schnellen axonalen Transport werden membranumhüllte Organellen in anterograde (vom Soma zum Axonende) bzw. retrograde (vom Axonende zum Soma) Richtung transportiert. Elemente des Zytoskeletts und zytosolische Proteine rücken über den langsamen axonalen Transport in Richtung Axonende vor. Sowohl die Geschwindigkeiten als auch ihre biochemischen Charakteristika weisen auf unterschiedliche Funktionsmechanismen des schnellen und langsamen Transportes hin. Maximale Transportgeschwindigkeiten betragen beim schnellen axonalen Transport 400 mm pro Tag, beim langsamen Transport 6 mm pro Tag. Kinesine gelten als „molekulare Motoren“ für den schnellen anterograden Transport, binden selektiv an membranöse Zellorganellen, z.B. synaptische Vesikel, sekretorische Granula oder Mitochondrien, und transportieren diese entlang der Mikrotubuli. Der schnelle retrograde Transport wird durch zytoplasmatisches Dynein vermittelt, welches ebenfalls an die Membran der Zellorganellen bindet und entlang der Mikrotubuli Richtung Zellsoma gleitet. Der Mechanismus des langsamen axonalen Transportes, dessen Geschwindigkeit etwa derjenigen des Auswachsens durchtrennter Axone entspricht, ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt.

Basierend auf der Richtung des axonalen Transportes wurde eine Reihe von anterograd- und retrograd wandernden Farbstoffen für das neuronale Tracing entwickelt. Eine effektive Gruppe neuronaler Tracermoleküle stellt die Entwick-

lung fluoreszierender Farbstoffe (true blue, RITC, Fluoro-Gold) dar, die neben ihrer Sensitivität die Möglichkeit bieten, multiple Konnektivitäten mittels unterschiedlicher Absorptions- und Emissionsmaxima gleichzeitig darzustellen. Zu den neueren, nicht-fluoreszierenden Farbstoffen gehören neben biotinylierten Dextranen und Neurobiotin v.a. *Phaseolus vulgaris* -Lektin (PHA-L) und Cholera-Toxin, die ebenfalls wie HRP mittels Licht- und/oder Elektronenmikroskopie visualisiert werden. Die Kombination von retrogradem neuronalen Tracing und Immunhistochemie erlaubt zusätzlich zur Kartierung axonaler Projektionsfelder den gleichzeitigen Nachweis bestimmter Neurotransmitter oder Transkriptionsfaktoren in den Perikarya projizierender Neurone. Vor allem durch die simultane Anwendung eines fluoreszierenden, retrograden Tracers mit indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Fluorochromen unterschiedlicher Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden die Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahren auch für den Hypothalamus deutlich erhöht (Kuypers *et al.*, 1979; Oldfield *et al.*, 1979, 1994; Sawchenko & Swanson, 1981). Autoradiographische Untersuchungen zeigten efferente Projektionen MnPO-intrinsischer Neurone einerseits zum parvozellulären, andererseits zum magnozellulären Anteil des PVN und den magnozellulären Neuronen des SON (Sawchenko & Swanson, 1981). Die Ergebnisse der HRP-Studien unterstützten die Hinweise auf eine direkte Projektion des MnPO in den SON (Weisinger *et al.*, 1990) und zeigten zusätzlich Synapsenbildung von Axonendigungen aus dem Bereich des MnPO mit vasopressinergen Neuronen des SON (McAllen *et al.*, 1980). Bezeichnend für die vielfältigen neuronalen Verbindungen des MnPO ist ihr überwiegend reziproker Charakter, was seine Rolle als integratives Kerngebiet unterstreicht (Gerstberger *et al.*, 2001). So wurden reziproke Projektionen zum SON, zum magno- sowie parvozellulären Anteil des PVN und zur medialen präoptischen Region nachgewiesen (Uschakov, submitted).

Projektionen von und zum SFO und OVLT innerhalb der *Lamina terminalis* sind besonders ausgeprägt (Camacho & Phillips, 1981; Miselis, 1981; Uschakov *et al.*, submitted). Dabei projizieren 20 % der efferent zum SFO verlaufenden Axone MnPO-intrinsischer Neurone über Kollaterale ebenfalls zum SON (Oldfield *et al.*, 1992). Zusätzlich zeigten Uschakov und Mitarbeiter (submitted) durch anterograde Tracingstudien, dass die Efferenzen des dorsalen und ven-

tralen Teils des MnPO zum OVLT hauptsächlich die „dorsal cap“ des OVLT als Zielstruktur mit einbeziehen und dessen zentrale, vaskuläre Komponente aussparen. Der MnPO seinerseits erhält afferente Eingänge aus Kerngebieten des Hirnstamms, welche ihrerseits Informationen von Baro-, Chemo- und Volumenrezeptoren aus der Peripherie afferent an den Hypothalamus übermitteln. So projizieren der *Nucleus parabrachialis lateralis* (LPBN) sowie die noradrenergen Zellgruppen des *Nucleus tractus solitarius* (NTS, A2) und der ventrolateralen *Medulla oblongata* (A1) zum MnPO (Edwards *et al.*, 1989; Loewy & McKellar, 1980; Saper *et al.*, 1983). Efferenzen vom MnPO zum Hirnstamm wurden hauptsächlich zur noradrenergen A6-Zellgruppe des *Locus coeruleus*, aber auch zu den noradrenergen A5- und A7-Gruppen gezeigt. Neben afferenten und efferenten Konnektivitäten des MnPO konnte durch Untersuchungen mit anterograd transportierten Tracern demonstriert werden, dass intranukleäre Konnektivitäten selbst zwischen den drei Substrukturen des MnPO bestehen (Uschakov, submitted).

Der MnPO gilt als integrative, neurogliale Struktur des anterioren Hypothalamus für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes (Johnson & Thunhorst, 1997), der Körperkerntemperatur (Gerstberger *et al.*, 2001) und des kardiovaskulären Systems (Tanaka *et al.*, 1995).

1.3. Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes

Im Rahmen der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts stellen das Volumen und die Natriumkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit (EZF) die wichtigsten Regelgrößen dar. Die EZF der meisten Säugetiere weist Osmolalitätswerte von 280 - 310 mosm/kg auf (Penzlin, 2004). Wird die Osmolalität der EZF z.B. durch orale NaCl-Aufnahme oder renalen/kutanen Wasserverlust erhöht, so wäre ein osmotisch induzierter Wasseraustritt aus dem Intrazellulärraum in die EZF die Folge, da beide im osmotischen Gleichgewicht stehen. Die Osmolalität der EZF unterliegt genau wie andere physiologische Parameter (patho-)physiologischen Schwankungen, die einer zentralen Regulation bedürfen. Die Verfügbarkeit von Wasser einerseits, sowie die Verluste von Wasser und Salz etwa durch Atmung oder *perspiratio insensibilis* andererseits hängen

von Umwelteinflüssen ab und können nur eingeschränkt regulatorisch vom Organismus beeinflusst werden. Dagegen wird deren gezielte Aufnahme durch Erzeugen des Durstgefühls und Salzappetits sowie die renale Exkretion von Wasser (Diurese/Antidiurese) und Natrium (Natriurese/Antinatriurese) durch die neuronale, neuroendokrine oder vegetative Kontrolle des Trinkverhaltens bzw. der Nierenfunktion gesteuert. Auf efferenter Seite des Regelkreises spielt dabei neben der Aktivierung des zentralen Durstmechanismus und einer Modulation der peripheren Sympathikusaktivität vor allem das Hypothalamus-Neurohypophysen System im medialen Part des anterioren Hypothalamus eine wichtige Rolle. Neuroanatomisch umfasst es den PVN, den SON und die Neurohypophyse. Die Perikarien der magnozellulären Neurone, welche das antidiuretische Hormone Vasopressin (AVP) sowohl synthetisieren als auch freisetzen, befinden sich im PVN und SON (Landgraf *et al.*, 1990). Die Axone dieser Neurone bilden eine Hypothalamus-Hypophysen-Achse, die in der Neurohypophyse endet. Über das engmaschige Gefäßsystem der Neurohypophyse gelangt AVP in den Blutkreislauf und bedingt letztendlich die renale Antidiurese. Durch Änderung der Impulsrate und -frequenz der hypothalamischen, magnozellulären Neurone als Reaktion auf eine veränderte Plasmakonzentration an Natrium bzw. ein verändertes EZF-Volumen wird der Plasmaspiegel des AVP reguliert (Renaud & Bourque, 1991; Grindstaff *et al.*, 1991). Die Homöostase von Osmolalität bzw. Natriumkonzentration sowie Volumen der EZF bedingt die Detektion der entsprechenden Ist-Werte durch zentrale und periphere Osmo- bzw. Volumenrezeptoren.

1.3.1. Zentrale Osmorezeptoren/zentrale Osmosensitivität

Zentrale Osmorezeptoren finden sich vor allem im anterioren Hypothalamus (AV3V-Region), im Bereich der sensorischen circumventrikulären Organe SFO und OVLT sowie des MnPO. E.B. Verney entdeckte 1947 als erster einen Zusammenhang zwischen der Plasmaosmolalität und der Freisetzung des Vasopressins in die Blutbahn. Durch Infusion einer hypertonen NaCl- oder Saccharose-, nicht jedoch Harnstoff-Lösung in die *Arteria carotis* eines euhydrierten Hundes konnte Trinkverhalten und eine Vasopressin-bedingte Antidiurese ausgelöst werden. Da NaCl und Saccharose bei Permeabilitäten von 10^{-9} -

10^{-12} cm/sec Zellmembranen nicht ohne weiteres permeieren können, Harnstoff hingegen eine Permeabilität von 10^{-5} cm/sec aufweist, wurde postuliert, dass NaCl und Saccharose, systemisch appliziert, zu einem intrazellulären Wasserverlust cerebraler Osmorezeptoren und somit zu einer zentralen Rezeption der erhöhten Plasmaosmolalität führten. Tierexperimentelle Läsions- und Applikationsstudien erbrachten den Hinweis, dass diese zentralen Osmorezeptoren im Bereich der präoptischen Region des Hypothalamus lokalisiert sind (Verney, 1957).

Erste Hinweise auf die Involvierung der antero-ventralen Region des dritten Ventrikels (AV3V) an der regulierten Freisetzung des AVP durch Änderung der Plasmaosmolalität lieferten Andersson *et al.* (1975). So verursachten Läsionsstudien des mittleren Vorderhirns inklusive der *Lamina terminalis* bei Ziegen eine ausgeprägte Adipsie; nach Infusion einer hypertonen NaCl-Lösung in die *Arteria carotis* blieb eine zu erwartende Antidiurese aus. Nach Läsion der AV3V-Region bei Ratten zeigte sich eine erhöhte Plasmaosmolalität, Hypernatriämie und Adipsie (Buggy & Johnson, 1977), und nach Trinkwasserentzug AV3V-läsionierter Tiere setzte nur ein mäßiges Trinkverhalten ein. Bei deutlich erhöhter Plasmaosmolalität erwies sich die Erhöhung der AVP-Konzentration als wesentlich geringer im Vergleich zu nicht-läsionierten Tieren (Carithers & Johnson, 1985). Gezielte Ablationen des OVLT oder des SFO bei Hunden, Ratten oder Schafen (Mangiapane *et al.*, 1984; McKinley *et al.*, 1984; Thrasher *et al.*, 1980) induzierten u.a. Adipsie und Hypernatriämie und deuteten darauf hin, dass osmorezeptive Strukturen auch in den sensorischen CVOs der *Lamina terminalis* lokalisiert sind. Bei Schafen bewirkte v.a. die kombinierte Ablation der *Lamina terminalis* Strukturen eine schwere Beeinträchtigung des Trinkverhaltens sowie der AVP-Freisetzung nach Infusion hypertonen NaCl-Lösung.

Bourque und Mitarbeiter (2007) untersuchten OVLT-intrinsische Neurone an hypothalamischen Gewebeschnitten und in frisch dissoziierten Kulturen in Calcium-freien Medien. Die Applikation hypertonen Lösungen führte in beiden Versuchsmodellen zu einer Depolarisation der Neurone und beruhte auf der Aktivierung nicht-selektiver Kationenkanäle. Dass neben dem OVLT auch das SFO an der hypothalamischen Osmorezeption beteiligt ist, demonstrierten *in*

vitro Untersuchungen an hypothalamischen Gehirnschnitt-Präparationen. SFO-intrinsische Neurone erhöhten ihre Entladungsrate nach Applikation von hypertoner NaCl- oder Mannitol-Lösung (Andersson *et al.*, 2000; Day & Sibbald, 1988). Läsionen des innerhalb der BHS positionierten MnPO führten ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der osmotisch induzierten AVP-Freisetzung (Mangiapane *et al.*, 1983). Extrazelluläre Ableitungen *in vivo* zeigten, dass neuronale Subpopulationen des MnPO, die efferent zum SON projizieren, ihre Entladungsrate nach systemischer Applikation von hypertoner NaCl-Lösung erhöhten, was auf deren Osmosensitivität hinwies (Aradachi *et al.*, 1996; McKinley *et al.*, 1992). Aufgrund elektrophysiologischer Studien wurde die Bedeutung des Zusammenspiels von MnPO, OVLT, ventraler AV3V Region und SON im Rahmen der hypothalamischen Osmoregulation postuliert. Elektrische Stimulation des MnPO und der ventralen AV3V führte zu Exzitationen von SON-Neuronen (Honda *et al.*, 1990). Die direkte Mikroinjektion von Lidocain als Lokalanästhetikum und Hemmstoff spannungsabhängiger Natriumkanäle in den MnPO unterdrückte die Exzitation von SON-Neuronen nach Stimulation der AV3V Region, was auf eine integrative Funktion des MnPO als Relaisstation hindeutete. Alle der untersuchten Neurone der AV3V Region, des MnPO und des SON wiesen nach Applikation einer hypertonen NaCl-Lösung Exzitationen auf. Dies führte zu dem Schluss, dass MnPO, OVLT, vAV3V und der SON nur gemeinsam einen potenten Osmorezeptor-Komplex bilden, der z.B. für die osmotisch kontrollierte Freisetzung des AVP verantwortlich ist (Honda *et al.*, 1990).

Neben der stereotaktischen Lokalisation der zentralen Osmorezeptoren ist die Spezifität dieser Rezeptoren Gegenstand intensiver Untersuchungen. So postulierten Andersson und Mitarbeiter (1977), dass intrahypothalamische, periventriculäre „Osmo“-Sensoren sensibler auf Änderungen der Natriumkonzentration als der Osmolalität der EZF reagieren und möglicherweise den Natriumgehalt der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) kontrollieren. Die Infusion hypertoner, mit NaCl-angereicherter „künstlicher“ CSF (aCSF) in einen der Lateral- bzw. den dritten Hirnventrikel bei Schafen induzierte Trinkverhalten und Antidiurese, während hypertone Saccharose diese Effekte nicht bewirkte, sondern den dipsogenen und antidiuretischen Reaktionen nach intracarotidaler Infusion einer

hypertonen NaCl-Lösung entgegenwirkte. McKinley *et al.* (1978) verglichen die Auswirkung der intracarotidalen Infusion von NaCl (1 M/L), Saccharose (2 M/L) und Harnstoff (6 M/L) auf die Harnproduktion und den Natriumgehalt der CSF beim Schaf. NaCl und Saccharose führten zu einer raschen Trinkantwort und Antidiurese, während Harnstoff kaum einen dipsogenen und antidiuretischen Effekt aufwies, jedoch die markanteste Erhöhung der Natriumkonzentration der CSF bewirkte. Bei Hunden induzierte Harnstoff eine Erhöhung der Osmolalität und des Natriumgehalts in der CSF, ohne ein dipsogenes Verhalten oder einen Anstieg der AVP-Sekretion zu bewirken (Thrasher *et al.*, 1980). Deutlich zeigte sich hier der osmotische Effekt der Saccharose, unabhängig von der Natriumkonzentration des CSF oder des Plasmas. Intracerebroventrikuläre Infusion einer hypertonen Saccharose-Lösung beeinflusste die Vasopressinsekretion weniger als eine hypertone NaCl-Lösung beim Schaf (McKinley *et al.*, 1978) und beim Rhesusaffen (Swaminathan, 1980), jedoch gleichermaßen beim Hund (Thrasher *et al.*, 1980), was auf Spezies-spezifische Unterschiede in der Frage nach der Existenz einer intrahypohalamischen Natrium- *versus* Osmosensitivität hinweist. Da es bei den genannten Läsionsstudien zumeist unklar blieb, ob letztendlich die Destruktion auf zellulärer Ebene oder die Verletzung durchziehender Axone zu den erzielten Effekten führte und darüber hinaus intracerebroventrikuläre Infusionen keine genauere Lokalisation Osmo- oder Natrium-sensitiver Strukturen zuließ, führten Peck *et al.* (1975) präzisere Studien durch. Durch die intracraniale Mikroapplikation einer hyperosmolaren Saccharose-Lösung in den Bereich der präoptischen Region und des anterioren Hypothalamus der Ratte konnten die Autoren je nach Lokalisation Trinkverhalten und/oder Antidiurese aufgrund erhöhter Vasopressin-Freisetzung auslösen.

Hinsichtlich zellulärer/molekularer Mechanismen, welche der hypothalamischen Osmosensitivität zugrunde liegen, stellten Bourque und Mitarbeiter (2002) die Theorie des „stretch“ Receptors auf, bei der Änderungen des Zellvolumens im Vordergrund der zellulären Perzeption einer geänderten Osmolalität der EZF stehen. Am Beispiel der magnozellulären, neurosekretorischen Neurone (MCN) des *Nucleus supraopticus* (SON) bzw. der Neurone des OVLT demonstrierten die Autoren mittels elektrophysiologischer patch-clamp Analysen das Vorkommen von transmembranalen Kanälen, die ihre Aktivität in Abhängigkeit vom

Dehnungszustand der Zellmembran ändern und definierten diese als „stretch inactivated“ ion channels (SIC) (Abb. 3). Übertragen auf die Osmosensitivität der MCNs, nämlich Zellschwellung bei hypotoner und Zellschrumpfung bei hypertoner Umgebung ergeben sich folgende Konsequenzen: Bei hypotoner Zellschwellung stellt sich eine Inaktivierung der SICs ein, die eine Reduktion der zellulären Kationenleitfähigkeit und somit eine Hyperpolarisation der Zellmembran zur Folge hat. Im Umkehrschluss führt eine hypertone Zellschrumpfung zu einer Aktivierung der SICs und somit zu einer erhöhten Kationenleitfähigkeit und folgerichtig Depolarisation der Zellmembran. Weiterführende Untersuchungen wiesen eine Gadolinium-Sensitivität dieses unspezifischen Kationenkanals nach (Abb. 3).

In dissoziierten Neuronen des SFO konnte kürzlich ein atypischer Na^+ -Kanal (Na_x) nachgewiesen werden, welcher sich als sensitiv für Änderungen des Natriumgehaltes der CSF unabhängig von deren Osmolalität erwies (Hiyama *et*

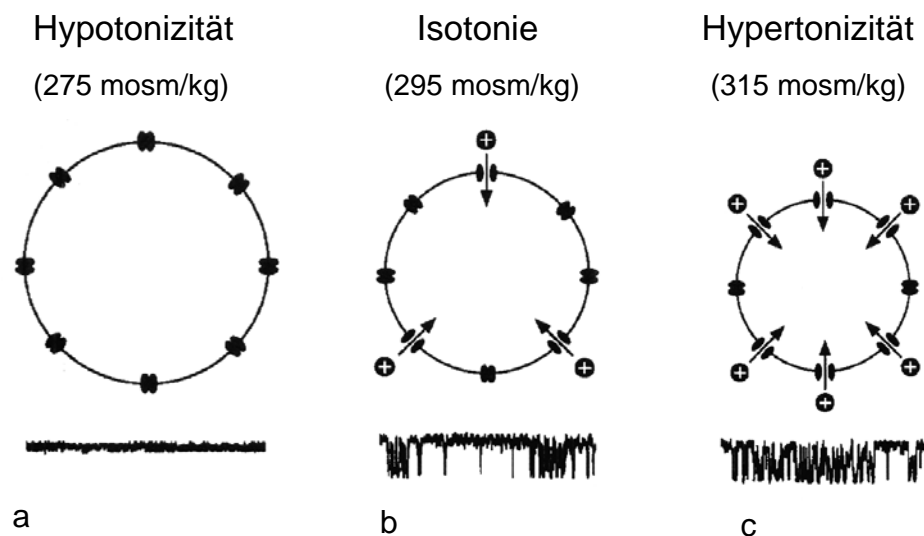


Abb. 3: Schematische Darstellung der „stretch-inactivated ion channels (SIC) im Rahmen der hypothalamischen, neuronalen Osmoperzeption

Bei physiologischer Osmolalität der EZF (ca. 295 mosm/kg) (b) ist lediglich ein Teil der SICs aktiviert und erlaubt einen limitierten Kationeneinstrom. Eine hypotone Umgebung (a) induziert eine Zellschwellung und führt zu einer Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit der SICs und somit Hyperpolarisation der Zelle. Im Gegensatz dazu bedingt Hypertonizität der EZF (c) eine Zellschrumpfung, diese wiederum eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der SICs. Der Anstieg des unspezifischen Kationeneinstroms induziert eine Depolarisation des Neurons.

al., 2004). *In situ* Hybridisierung zeigte eine Expression der Na_x-Kanal mRNA in verschiedenen Regionen des Hypothalamus, v.a. den sensorischen CVOs wie dem SFO (Goldin *et al.*, 2000; Hiyama *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2000). Grob *et al.* (2004) postulierten darüber hinaus die Existenz eines spezifischen Natriumsensors in Neuronen des dorsalen und ventralen MnPO. Anhand elektrophysiologischer Studien wiesen die Autoren bei diesen MnPO-Neuronen einen außergewöhnlich hohen Membranwiderstand nach, worin sie die Erklärung für die neuronale Na⁺-Sensitivität in Strukturen der *Lamina terminalis* sahen. Schon eine marginale Zunahme der extrazellulären Natriumkonzentration erwies sich als ausreichend, um die MnPO-intrinsischen Neurone zu depolarisieren und eine „spike“ Aktivität zu induzieren. Durch die fehlende Gadolinium-Sensitivität schlossen die Autoren einen Zusammenhang mit den SICs aus.

Genetische und molekularbiologische Untersuchungen lieferten kürzlich Hinweise darauf, dass Mitglieder der *transient receptor potential vanilloid* (TRPV) Kanal-Familie eine Rolle bei der zellulären Osmosensitivität spielen könnten. Anhand von Untersuchungen der Signaltransduktion bei Metazoen konnte für die Subtypen TRPV-2 (Muraki *et al.*, 2003) und TRPV-4 (Liedtke, 2005, 2007; Strotmann, 2000) auch bei Säugetieren eine Beteiligung an der Übertragung osmotischer Informationen nachgewiesen werden. So zeigten TRPV-4 (-/-) „knock-out“ Mäuse nach systemischer, osmotischer Stimulation ein reduziertes Trinkverhalten und eine verminderte AVP-Freisetzung (Liedtke *et al.*, 2003). Neueste Untersuchungen implizierten zusätzlich eine Involvierung des TRPV-1 Gens, da TRPV-1 (-/-) Mäuse vergleichbar zu TRPV-4 (-/-) Mäusen auf einen hypertonen Stimulus reagierten (Ciura & Bourque, 2006; Strotmann *et al.*, 2000). Zusätzlich ergaben *in vitro* Studien von Ramsey und Mitarbeitern (2006), dass die hypertone Aktivierung OVLT-intrinsischer Neurone der Wildtyp-Maus nach Zugabe von Ruthenium Red, einem TRPV -spezifischen Kanalblocker, supprimiert werden konnte. Über eine zelluläre Expression der osmosensitiven TRPVs im MnPO selbst ist bislang nichts bekannt.

1.3.2. Periphere Osmorezeptoren

Nach Infusion hyper- bzw. hypotoner NaCl-Lösungen in das Pfortadersystem der Rattenleber *in vivo* zeigten elektrophysiologische Studien eine Zunahme der Aktionspotentialfrequenz der hepatischer Anteile des *Nervus vagus* bei Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen (Adachi *et al.*, 1976; Andrews & Orbach, 1974; Nijima, 1969). Nach Läsion des *N. vagus* auf Ebene des Diaphragmas konnten Baertschi und Vallet (1981) bei Hunden eine Abnahme der AVP-Ausschüttung nach Infusion hypertoner Lösungen in das Pfortadersystem nachweisen. Die Aktivierung des Hypothalamus-Neurohypophysen Systems nach hypertoner Stimulation potentieller Osmorezeptoren im Innervationsgebiet des *Nervus splanchnicus* konnte nach Lokalanästhesie des thorakalen Rückenmarkes unterdrückt werden (Vallet & Baertschi, 1982). Somit wurde die Existenz peripherer Osmorezeptoren im durch den *N. splanchnicus* versorgten Mesenterium, im Pfortadersystem und der Leber selbst postuliert. Zusätzlich erhielten Bisset und Chowdry (1988) Hinweise auf die Lokalisation von Osmorezeptoren im Bereich des Oropharynx und des Magens für die frühe Detektion osmotischer Stimuli durch oral aufgenommene Flüssigkeiten und Nahrungsbestandteile. Die afferente Signaltransduktion bezüglich Osmolalität, Tonizität oder Natriumkonzentration der EZF werden über den *N. vagus* primär zum NTS (Kobashi & Adachi, 1985) und in die *ventrolaterale Medulla* (King & Baertschi, 1992) des Hirnstammes übermittelt. Durch neuroanatomische und elektrophysiologische Untersuchungen konnten axonale Projektionen von diesen Arealen zu den magnozellulären Anteilen des PVN und des SON (Kannan & Koizumi, 1981; Tribollet *et al.*, 1985), als Produktionsstätten des AVP, und den MnPO nachgewiesen werden (Edwards *et al.*, 1989; Saper *et al.*, 1983). Hierbei handelt es sich um eine dichte, noradrenerge Innervation, ausgehend von der A1-Zellgruppe der ventrolateralen Medulla, der A2-Gruppe des NTS und der A6-Zellgruppe des *Locus coeruleus* (Grindstaff *et al.*, 2000).

1.3.3. Periphere Volumenrezeptoren

Veränderungen der Tonizität der EZF von etwa 1-2 % führen zur Perzeption durch systemische und/oder zentrale Osmo-/Natriumsensoren, und nachfolgender Modulation zentraler (Wasseraufnahme, Salzappetit, AVP-Freisetzung) und

peripherer (Nierenausscheidung, Sympathikusaktivität) Effektorsysteme. Die Freisetzung des AVP aus den neurohypophysären Nervenendigungen der MCN wird jedoch nicht nur durch eine erhöhte Osmolalität der EZF, sondern auch eine Reduktion des EZF-Volumens stimuliert (Thrasher, 1994). Das volumenregulatorische System ist durch eine vermeintlich geringere Sensitivität charakterisiert. So bedingt erst eine isotone Verringerung des Blutvolumens um 10 % bei Hund und Ratte, und mehr als 15 % bei der Ziege - vergleichbar mit einer Reduktion des EZF-Volumens um 3 - 5 % - eine Aktivierung der Volumensensoren (Share, 1980). Von Gauer (1972) erhobene Sensitivitätsmessungen der B-Typ Dehnungssensoren der *Atria* ergaben eine Abnahme der mittleren Impulsfrequenz um 30 % bei einer Reduktion des EZF-Volumens um etwa 2 %. Afferente Nervenimpulse von Dehnungsrezeptoren in der *Vena cava*, im rechten und teilweise linken *Atrium*, im Aortenbogen und *Sinus caroticus* inhibierten die AVP-Sekretion, während die Abnahme der Impulsrate die Freisetzung erhöhte (Bisset & Chaudry, 1988). Barorezeptoren des *Atrium* und des Ventrikels signalisieren Änderungen des Blutvolumens, während Rezeptoren im Aortenbogen und *Sinus caroticus* Änderungen des arteriellen Blutdrucks detektieren. Diese peripheren Informationen über den Status des intravasalen Blutvolumens und arteriellen Blutdruckes werden über Afferenzen des *N. vagus* und des *N. glossopharyngeus* an den NTS des Hirnstamms weitergeleitet.

Durch anterograd-virale Tracingstudien mit einem attenuierten Lentivirus konnten Card *et al.* (2006) die efferente, catecholaminerge Projektion von Neuronen der rostroventrolateralen Medulla zu den hypothalamischen Kerngebieten des SON, PVN und MnPO aufzeigen. Dies weist zum einen auf eine zentrale Rolle des MnPO im Rahmen der Regulation des Blutvolumens und – druckes hin und verdeutlicht andererseits die Beteiligung des noradrenergen Transmittersystems (siehe Kap. 1.6). Die Läsionierung der AV3V Region inklusive des MnPO bei der Ratte erzeugten markante Beeinträchtigungen des Flüssigkeitshaushaltes, aber auch des kardiovaskulären Systems. Präzisere Läsionen des MnPO unterdrückten durch AngII, Hyperosmolalität oder Hypovolämie induziertes Trinkverhalten (Cunningham *et al.*, 1991, 1992; Gardiner *et al.*, 1983; Mangiapane *et al.*, 1983), sowie die Sekretion von Vasopressin und die zentral vermittelte pressorische Reaktion (Yasuda *et al.*, 2000). In elektrophysiologischen

Studien an der Ratte zeigten Tanaka *et al.* (1993), dass Neurone des MnPO, welche ihrerseits in den PVN projizierten, sich teilweise als barosensitiv erwiesen. Bei Ratten konnte eine ausgeprägte Sensitivität für vom MnPO in den SON projizierende Neurone sowohl auf Änderungen des Blutvolumens als auch der Plasmaosmolalität ermittelt werden (Aradachi *et al.*, 1996). Durch Abnahme des Blutdrucks und/oder des Blutvolumens induzierten Johnson *et al.* (1985) eine synaptische Freisetzung von NA der aufsteigenden noradrenergen, medullären Projektionen im Bereich der *Lamina terminalis*. Weiterführende Studien ergaben, dass die Efferenzen des NTS zum MnPO und die präoptische Region hauptsächlich noradrenerg, die Projektionen der ventrolateralen Medulla zu gleichen Teilen noradrenerg und adrenerg sind (Day *et al.*, 1980; Saper *et al.*, 1983; Tucker *et al.*, 1987). Diesen Ergebnissen folgend erzeugte die Reduktion des EZF-Volumens eine erhöhte NA-Konzentration im SFO (Tanaka *et al.*, 1998) und einen erhöhten NA-Turnover im Bereich des MnPO (Wilkin *et al.*, 1987). Mikrodialysestudien detektierten einen signifikanten Anstieg der NA-Freisetzung im MnPO der Ratte nach elektrischer Stimulation des OVLT (Ushigome *et al.*, 2004), des SFO (Kariya *et al.*, 1992) und nach systemischer Hypovolämie (Miyakubo *et al.*, 2003). Auf zellulärer Ebene bewirkte die *in vivo* Stimulation der A1-Region eine α -Adrenozeptor vermittelte Erhöhung der Erregbarkeit der MnPO-intrinsischen Neurone (Kariya *et al.*, 1992). Somit zeigte sich, dass NA einen wichtigen Neurotransmitter in der *Lamina terminalis* im Rahmen der hypothalamischen Kontrollfunktion zur Konstanzhaltung des EZF-Volumens darstellt (siehe Kap. 1.6).

1.3.4. MnPO und efferente Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes

Das wichtigste Effektororgan zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes stellt die Niere dar, welche die cardiovaskuläre und Elektrolythomöostase durch drei Prinzipien kontrolliert: Modulation der Natriumausscheidung, der Wasserausscheidung und der Reninsekretion. Die Nierenfunktion wird zum einen vielfach humoral, zum anderen neural kontrolliert. Sympathische Nervenfasern innervieren dabei Komponenten des renalen Gefäßsystems, des Tubulussystems sowie die granulären Zellen des juxtaglomerulären Apparates, vor

allein die modifizierten Intimazellen der *Vasa afferentia*. Über Änderungen der renalen sympathischen Nervaktivität (RSNA) werden die Produktion und Sekretion des Renins und somit sekundär die renale Perfusion, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie der tubuläre Wasser- und Elektrolyttransport gesteuert (DiBona, 2000). Die Reninsekretion wird durch die NA-Freisetzung und nachfolgende Stimulation von β_1 -Adrenozeptoren auf der Ebene der afferenten Arteriolen moduliert. So führt z.B. die elektrische Stimulation der renalen Nerven zur synaptischen Freisetzung von Noradrenalin und dadurch nachfolgender, erhöhter Aktivität des systemischen sowie intrarenalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (Yamaguchi *et al.*, 2000). Intrarenal wie auch systemisch gebildetes AngII bedingt, AT₁-Rezeptor vermittelt, eine erhöhte Rückgewinnung von Wasser und Natrium, die in erster Linie auf die durch Vasokonstriktion bedingte Erniedrigung der renalen Perfusion und GFR, teilweise auch auf gesteigerte tubuläre Resorption zurückzuführen ist (DiBona, 2000). Darüber hinaus stimuliert AngII präsynaptisch die Freisetzung von Noradrenalin aus RSN-Endigungen in der unmittelbaren Umgebung tubulärer Epithelzellen sowie Endothelzellen der Gefäße (Boke & Malik, 1983).

Hinweise auf eine Beteiligung der *Lamina terminalis* des anterioren Hypothalamus im Rahmen der efferenten Regulation der Nierenfunktion erbrachten Mikroapplikationen von AngII in die *Lamina terminalis*, die bei Ratten die Reninsekretion (Weekly, 1992) und bei Schafen die RSNA erniedrigte (May & McAllen, 1997). Beide Effekte konnten durch zentrale Ablation der *Lamina terminalis* unterbunden werden. Sly *et al.* (1999) gelang es mittels renaler Applikation eines attenuierten *Pseudorabies* Virus als retrogradem, transsynaptischen Tracer, eine direkte efferente, polysynaptische Verbindung vom ZNS zur Niere darzustellen. Neben der Markierung der rostroventralen *Medulla*, des *Nucleus raphe*, des NTS und des *Locus coeruleus* zeigten sich u.a. hohe Viruskonzentrationen im PVN, im OVLT, im SFO, in der präoptischen Region, im *Nucleus striae terminalis* und im MnPO. Die elektrische Stimulation der AV3V Region bzw. des MnPO bewirkte bei der Ratte einen Anstieg der RSNA und des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP). Höchstwahrscheinlich wurden diese Effekte über den parvozellulären Teil des PVN direkt an die präganglionären Neurone des intermediolateralen Horns des Rückenmarks übermittelt. Anstieg

von RSNA und MAP konnten durch die lokale Applikation des Anästhetikums Lidocain in den MnPO oder von Cobaltchlorid als transsynaptischem Blocker bilateral in den PVN vermindert werden. Nach intraventrikulärer Infusion hypertoner NaCl-Lösung erhöhten sich erwartungsgemäß RSNA und MAP; die Aktivierung beider Effektorsysteme konnte wiederum durch Lokalanästhesie des MnPO unterbunden werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass der MnPO die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes nicht nur durch die Kontrolle der AVP Sekretion und Wasseraufnahme reguliert, sondern auch Einfluss auf die sympathische Innervation und somit auch auf die Regulation der Nierenfunktion nimmt (Yasuda *et al.*, 2000).

1.3.5. „IEG-mapping“ nach osmotischer und Volumenstimulation

Der molekularbiologische bzw. immunhistochemische Nachweis einiger Transkriptionsfaktoren als „immediate early gene“ Produkte in zentralen Neuronenverbänden eröffnete Ende der 1980er Jahre erstmals die Möglichkeit, bei nicht instrumentierten, wachen Versuchstieren eine spezifische Aktivierung von Nervenzellen im ZNS unter verschiedenen (patho-)physiologischen Versuchsbedingungen sowie nach pharmakologischer Manipulation *in vivo* ohne invasive Instrumentierung der Versuchstiere aufzuzeigen (Curran & Morgan, 1987; Morgan *et al.*, 1987). Der zelluläre Nachweis des aus dem Zytosol nukleär translozierten Fos-Proteins stellt eine weitverbreitete Anwendung zur Markierung „aktivierter“ Neurone dar, so auch im Rahmen neurobiologischer Studien zur hypothalamischen Kontrolle der Körperkerntemperatur bzw. des Salz- und Wasserhaushaltes (Gerstberger *et al.*, 2001; Rowland, 1998).

Das instabile, nukleäre Phosphoprotein Fos repräsentiert das phosphorylierte Translationsprodukt des c-fos Gens, welches zu den Protoonkogenen zählt (Sambucetti & Curran, 1986). Diese werden anhand der durch sie kodierten Proteine in mehrere Gruppen eingeteilt, wobei das Produkt des c-fos Genes den nukleären Transkriptionsfaktoren zugeordnet wird. Zusammen mit dem Protoonkogen c-myc zählt c-fos zu der Gruppe der sog. „immediate early genes“ (IEG), die bei vielen Signalkaskaden die erste Antwort der Zelle auf extra- oder intrazelluläre Reize darstellen, und deren Genprodukte als Trans-

kriptionsfaktoren ihrerseits nachfolgend die Aktivierung/Repression spezifischer Gene induzieren. Die Expression des Fos-Proteins erfolgt nach Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle innerhalb von 30 - 45 min, wodurch jedoch kein direkter zeitlicher Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und Translokation des Fos-Proteins in den Zellkern abgeleitet werden kann (Morgan & Curran, 1989). Das Fos-Protein besteht bei Mensch und Maus aus 380, bei der Ratte aus 430 Aminosäuren. Mit dem Produkt anderer Protoonkogene aus der Jun-Familie bildet es als Heterodimer den Transkriptionsfaktor AP1 und reguliert so im Zellkern die Transkription vieler an Zellwachstums- und -differenzierungsprozessen beteiligter Gene (Chiu *et al.*, 1988; Morgan & Curran, 1988; Rauscher *et al.*, 1988). „IEG-mapping“ kann nur dann als spezifischer Indikator für neuronale Aktivität herangezogen werden, wenn unter nicht stimulierten Bedingungen keine oder nur wenige Zellen immunhistochemisch detektierbares, in den Zellkern transloziertes Fos-Protein enthalten (Rowland, 1998). Eine konstitutive Expression von Fos ist im Rattengehirn lediglich im *Cortex piriformis* und im *Thalamus dorsomedialis* zu finden. Die Halbwertszeit dieses Proteins beträgt eine Stunde und die Zahl Fos-immunoreaktiver (Fos-IR) Zellen ist dann meist maximal und bleibt für 1 - 3 Stunden *post-stimulus* konstant (Rowland, 1998). Besonders im Hinblick auf die Sensitivität der Fos-Expression zeigte sich im direkten Vergleich mit anderen IEG-kodierten Proteinen wie Fos B, Jun, Jun B, Jun D und Krox-24 bei unterschiedlichen Zeiten, dass Fos den effektivsten Marker für neuronale Aktivität im Hypothalamus darstellt (Blume *et al.*, 2005; Lanteri-Minet *et al.*, 1994; LeBrun *et al.*, 1995). So bietet der histologische Nachweis der nukleären Translokation des Fos-Proteins eine geeignete Möglichkeit, neuronale Aktivierung im Bereich des Hypothalamus (Raivich & Behrens, 2006), und hier speziell nach Beeinflussung des thermo- bzw. osmoregulatorischen Regelkreises immunhistochemisch nachzuweisen (Gerstberger *et al.*, 2001; Patronas *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2002).

Alle veröffentlichten Studien bei Ratten zeigten nach einem 24-stündigen Trinkwasserentzug Fos-IR im SON und PVN. Zusätzlich zu diesen magnozellulären, neurosekretorischen Strukturen wiesen viele Arbeitsgruppen markante Fos-IR im MnPO, OVLT und moderate Fos-IR im SFO nach (Arnhold *et al.*, 2007; Fenelon *et al.*, 1993; Hamamura *et al.*, 1992; McKinley *et al.*, 1994; Morien *et*

al., 1999; Santana *et al.*, 2007; Sladek & Olschowka, 1994; Xu & Herbert, 1996). Die Verteilung Fos-IR Zellen bei dehydrierten Mäusen ähnelt der von Ratten mit Markierungen im SON, PVN, MnPO, SFO und OVLT (Ueta *et al.*, 1995). Osmotische Stimulation durch intraperitoneale Applikation einer hyper-tonen NaCl-Lösung induzierte auch bei Hühnern, Tauben, Wachteln und Finken eine Fos-Expression im OVLT, SFO, SON und PVN, was darauf hinweist, dass der Osmorezeptorkomplex bei Säugetieren und Vögeln ähnlich konzipiert zu sein scheint (Sharp *et al.*, 1995).

Durch geringen Blutverlust wird eine Reduktion des Blutvolumens ohne Veränderung der Plasmaosmolalität und des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) erreicht (isotone, normotensive, intravasale Hypovolämie). In Fos-Studien an Ratten wurden durch akute, intravasale Hypovolämie spezifische neurogliale Strukturen in der *Medulla oblongata* und im Hypothalamus aktiviert (Badoer *et al.*, 1992, 1993; Petrov *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1992; Ueta *et al.*, 1995). Eine transendotheliale Verschiebung der EZF kann durch die intraperitoneale oder subkutane Verabreichung von hyperonkotischem, kolloidalen Polyethylenglycol (PEG) erreicht werden. Die Applikation von PEG beeinträchtigt weder die Natriumkonzentration des Plasmas noch den MAP (Stricker *et al.*, 1979; Stricker & Verbalis, 1986), und bedingt somit eine isotone, normotensive, intravasale Hypovolämie. Den Effekt der PEG-induzierten Hypovolämie auf die Expression von Fos dokumentierten Smith und Day (1995) durch i.p. Injektion einer 30 %-PEG-Lösung. Es konnte Fos-IR im SFO, OVLT und MnPO detektiert werden. Han *et al.* (1995) und Rowland *et al.* (1998) stellten nach subkutaner PEG-Injektion zusätzliche Fos-Expression im magnozellulären SON und PVN dar.

1.4. Homöostase der Körperkerntemperatur

Die Körperkerntemperatur von Säugern liegt unabhängig von der Körpergröße Spezies-spezifisch zwischen 36,0 und 39,0°C. Um diese jeweils in den engen physiologischen Grenzen ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) ihres Sollwertes konstant zu halten, bedient sich der Organismus homoiothermer Tiere im Rahmen eines Regelkreises verschiedener Stellglieder bzw. Effektormechanismen (Crompton *et al.*, 1978; Hensel *et al.*, 1973; Simon, 1997). Die Grundlage hierfür ist eine autonome Tempe-

raturregulation, welche efferente Mechanismen sowohl zur Steuerung der Wärmeabgabe als auch zur regulatorischen Wärmebildung beinhaltet. Hierzu gehören die evaporative Wärmeabgabe mittels Hecheln, Schwitzen oder Salivation, Änderung der peripheren Durchblutung, also Vasokonstriktion oder -dilatation, Piloerektion zur Reduktion der äußeren Konvektion, muskuläres Zittern und die zitterfreie Thermogenese durch Aktivierung des braunen Fettgewebes (Chen *et al.*, 1998; Roth, 2000; Simon *et al.*, 1986; Simon, 1997). An der Koordination dieser efferenten thermoregulatorischen Effektormechanismen ist die *präoptische Region* (POA) des Hypothalamus maßgeblich beteiligt (Boulant, 1981). Um die Körperkerntemperatur in ihren engen Grenzen konstant zu halten, bedarf es einer präzisen afferenten Übermittlung thermischer Informationen an die integrativen Strukturen des Gehirns.

1.4.1. Periphere Thermorezeptoren und afferente Signaltransduktion

Bekanntermaßen werden bei Säugetieren und Vögeln Änderungen der Umgebungstemperatur bzw. der Körperoberflächentemperatur durch kutane Thermosensoren perzipiert und nach zentral vermittelt (Boulant, 1998; Reiner *et al.*, 1980). Bei beiden Tierklassen wird zusätzlich zu Warm- und Kaltsensoren in der Haut die Existenz tiefer gelegener Sensoren im Körperinneren (Bauch- und Brustorgane, Gefäße und Muskulatur) diskutiert. Die Körperkerntemperatur wird darüber hinaus von thermosensitiven Strukturen der POA, des anterioren Hypothalamus, des Hirnstamms und des Rückenmarks registriert (Boulant, 1998; Griffin *et al.*, 1996; Hammel *et al.*, 1976; Schmidt & Simon, 1982; Simon *et al.*, 1986; Simon, 1997). Kutane Informationen beruhen dabei verstärkt auf Afferenzen von Kaltsensoren, während die sensorischen Strukturen im Körperkern vornehmlich warmsensitiv sind (Simon *et al.*, 1996; Simon, 2000). Bei den kutanen Kaltsensoren handelt es sich um kolbenartige Terminalstrukturen markloser C-Fasern bzw. dünner, myelinisierter A δ -Fasern (Hensel *et al.*, 1974; Heppelmann *et al.*, 2001), bei den noch ungenügend charakterisierten Warmsensoren vorwiegend um freie Nervenendigungen von C-Faser Afferenzen (Vasilenko, 2000).

Periphere Temperatursensoren sind Proportional-Differential Fühler mit hoher Temperaturempfindlichkeit, wobei sich eine parabolische Kennlinie mit einem für den jeweiligen Sensor charakteristischen Maximalwert der Entladungsrate ergibt (Pierau, 2001). Der Arbeitsbereich der kutanen Kaltsensoren liegt zwischen 5 und 40°C. Die Temperaturabhängigkeit der elektrogenen Natrium-Kalium-Pumpe im Bereich der C-Faser Endigungen scheint an der temperaturabhängigen Änderung des Generatorpotentials von Kaltsensoren beteiligt zu sein. Die Blockade eines niederschweligen Calciumkanals durch Menthol führt zur Kälteempfindung und legte in den 1990er Jahren die Beteiligung einer Calciumleitfähigkeit nahe (Schäfer *et al.*, 1990). Neueste Ergebnisse bezüglich des zugrunde liegenden Erregungsmechanismus von Kaltsensoren deuten jedoch eher darauf hin, dass es sich um das Kälte-induzierte Öffnen unspezifischer Kationenkanäle, sogenannter „auswärts gleichrichtender“ Calciumkanäle handelt, die der Familie der TRP-Kanäle (*transient receptor potential*) angehören (McKemy *et al.*, 2002; Okazawa *et al.*, 2002). So reagiert der Trpm8 mit einem depolarisierenden Calciumeinstrom auf Abkühlung sowie auf die pharmakologische Aktivierung mittels Menthol (McKemy *et al.*, 2002; McKemy, 2007; Peier *et al.*, 2002); er weist einen maximalen Aktivierungsbereich bei 25 – 28°C auf. Ein zweiter Ionenkanal (Akntm 1) wurde *in vitro* bei Temperaturen erst unterhalb von 17°C aktiviert (Patapoutian *et al.*, 2003).

Bei der Erregung der Wärmesensoren spielen ebenfalls TRP-Ionenkanäle eine wichtige Rolle. Man unterscheidet vier Rezeptorsubtypen (TRPV-1 bis TRPV-4), die bei Säugetieren insgesamt die Spannweite (patho-)physiologisch vorkommender Temperaturen abdecken. Neben TRPV-1 und TRPV-2, welche erst bei Temperaturen über 42°C direkt depolarisierbar und somit eher der Schmerz- als Temperaturperzeption zuzuordnen sind, lassen sich TRPV-3 Kanäle bei Temperaturen von 34 – 38°C und TRPV-4 von 27 – 34°C aktivieren (Benham *et al.*, 2003; Caterina, 2007; Patapoutian *et al.*, 2003; Wechselberger *et al.*, 2006). TRPV-4 konnte z.B. in den Keratinozyten der Epidermis lokalisiert werden (Caterina, 2007).

Als Messfühler des Regelkreises zur Konstanthaltung der KT übermitteln die peripheren Thermosensoren die aktuellen Istwerte der lokalen Hauttemperatur

über sensorische Afferenzen an die *Laminae* I und II im Hinterhorn des Rückenmarkes. Nämliches gilt für die Afferenzen aus tiefen Körperregionen. Hier erfolgt die Umschaltung auf Interneurone bzw. spinale thermoresponsive Neurone. Im *Tractus spinothalamicus* (= Vorderseitenstrang) steigt der größere Teil der aufsteigenden Fasern zum Ventrobasalkomplex des Thalamus und führt über somatosensorische Areale des Cortex zur Wahrnehmung peripherer Temperatursignale (Craig *et al.*, 1994; Pierau, 2001). Der andere Teil der aufsteigenden Fasern gelangt über retikuläre, multisynaptische Bahnen entweder direkt in den Hypothalamus, oder nach Umschaltung der Afferenzen im Bereich des medullären *Nucleus raphe* und anschließender Weiterleitung an hypothalamische Strukturen wie die POA (Simon, 1997). Der exakte Verlauf der somatosensorischen Bahn vom Hinterhorn des Rückenmarks über den pontinen *Nucleus parabrachialis lateralis* zur POA und vorrangig dem Kerngebiet des MnPO konnte kürzlich durch die Kombination elektrophysiologischer Experimente und viraler Tracingstudien erstmals eindeutig nachgewiesen werden (Nakamura & Morrison, 2007). Die POA (sowie der MnPO) stellt(en) somit einen wichtigen Endpunkt multisynaptischer, afferenter Nervenbahnen aus der Peripherie an das ZNS im Rahmen der Thermoregulation dar.

1.4.2. Zentrale Thermorezeptoren / zentrale Thermosensitivität

Hypothalamisch präoptische Neurone weisen ebenfalls eine intrinsische Thermosensitivität auf (Boulant, 2000; Hammel, 1965). Dies bedeutet, dass diese Neurone in der Lage sind, direkt die lokale, intrahypothalamische Temperatur zu erfassen. Somit integriert die POA Informationen, vermittelt sowohl über periphere als auch lokale, in der POA befindliche Thermosensoren, gleicht diese mit dem internen „Sollwert“ für die physiologische Körperkerntemperatur ab und koordiniert die thermoregulatorischen Effektormechanismen (Boulant, 1998; Griffin *et al.*, 1996; Nagashima *et al.*, 2000). Die meisten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführten Untersuchungen ergaben ein Vorherrschen warm- gegenüber kaltsensitiven Neuronen auf der Ebene der POA. Sowohl die efferente Kontrolle der Wärmeproduktion als auch der Wärmeabgabe wird in erster Linie durch Signale warm- und nicht kalt-sensitiver Neurone der POA vermittelt (Kanosue *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 1993; Simon, 2000) (Abb. 4). Nach

heutiger Auffassung agieren die warmsensitiven Neurone der POA sowohl als Thermosensoren bezüglich der lokalen Gehirntemperatur als auch Thermointegratoren afferenter Informationen kutaner und viszeraler Thermosensoren (Benarroch, 2007).

Während ältere Studien an hypothalamischen Gehirnschnittpräparationen nahe legten, dass die Warmsensitivität hypothalamischer Neurone auf der Präsenz depolarisierender, TTX-sensitiver Natriumströme beruht (Kiyohara *et al.*, 1990), postulierten Boulant und Mitarbeiter (Boulant, 2006; Zhao & Boulant, 2005), dass die neuronale Thermosensitivität in erster Linie durch transiente Membranströme bedingt ist, welche die depolarisierenden Präpotentiale (= Schrittmacherpotentiale) zwischen aufeinander folgenden Aktionspotentialen bestimmen. Dabei kommt der temperaturabhängigen Inaktivierung eines kurzzeitigen Kaliumaustroms (A-Strom) nach erfolgtem Aktionspotential und somit erhöhter neuronalen Entladungsrate eine besondere Bedeutung zu (Griffin *et al.*, 1996).

1.4.3. „IEG-mapping“ nach Wärmeexposition

Die Expression und nukleäre Translokation der Proteinprodukte einiger „immediate early genes“ wie Fos z.B. in Neuronen des Hypothalamus stellt – wie schon für die Osmoregulation gezeigt (Kap. 1.3.5) – eine geeignete Möglichkeit dar, thermisch induzierte, neuronale Aktivierungsmuster sowie die Beteiligung hypothalamischer oder medullärer Neuronenpopulationen an den zentralen Mechanismen der Thermoregulation aufzuzeigen. Unter Bedingungen einer milden Wärmeexposition bis hin zum Hitzestress, einer Kälteexposition sowie der pharmakologischen Induktion von Fieber wurden zahlreiche Studien mit molekularbiologischem oder immunzytochemischem Nachweis der Fos-Translokation durchgeführt. So verursachte eine zweitägige Hitzeexposition die 5 - 10 fache Zunahme der Anzahl Fos-IR Neurone in der medialen POA, der ventromedialen präoptischen Region (VMPO) und der lateralen hypothalamischen Region (LHA) (Gerstberger *et al.*, 2001; Patronas *et al.*, 1998). Akuter Hitzestress zwischen 33 – 34°C für 45 min bis zu 3 h induzierte eine deutliche Fos-IR in der medialen und lateralen POA (inklusive OVLT und MnPO) und dem lateralen Septum (LS). Die anterio- und ventromedialen Teile der medialen POA

wiesen die stärkste Markierung auf (du Plessis *et al.*, 2006; Kiyohara *et al.*, 1995; McKittrick, 2000; Santana *et al.*, 2007; Scammell *et al.*, 1993). Auch die Hitzeexposition von Mäusen und die pharmakologische Induktion von Fieber beim Schwein führten zu einer Fos-Expression in Strukturen wie MnPO, MPA, PVN, OVLT und LS (Bachtell *et al.*, 2003; Harikai *et al.*, 2003; Vellucci & Parrott, 1994). Somit stellt der immunhistochemische Nachweis des Fos-Proteins ein probates Mittel dar, spezifische Aktivierungsmuster in hypothalamischen Kerngebieten im Rahmen der Aufrechterhaltung der KT darzustellen.

1.4.4. Präoptische Region (inkl. MnPO) und efferente Kontrolle des Wärmehaushaltes

Im Rahmen des thermoregulatorischen Regelkreises induzieren Abweichungen vom Sollwert Wärmeabgabe- bzw. Wärmebildungsmechanismen. Bereits 1930 konnte gezeigt werden, dass die Erwärmung der präoptischen Region bei Versuchstieren eine Reihe von regulatorischen Wärmeabgabemechanismen (Erhöhung der Salivation, Hecheln, Erhöhung der kutanen Durchblutung, Verhaltensänderungen etc.), die Kühlung dieser neurogliale Struktur andererseits Wärmebildungsmechanismen (Zittern, zitterfreie Thermogenese, kutane Vasokonstriktion etc.) auslöste (Simon *et al.*, 1996; Simon 1997).

1.4.4.1. Wärmebildungsmechanismen

Zittern stellt einen unfreiwilligen Tremor der Skelettmuskulatur dar – einhergehend mit der Freisetzung von Wärme – der physiologisch z.B. durch Kälte ausgelöst wird (Nagashima *et al.*, 2000). Durch Ablationsstudien und elektrophysiologische Stimulationen konnte der posteriore Hypothalamus als wesentliche Kontrollstruktur des thermoregulatorisch relevanten Zitterns identifiziert werden (Stuart *et al.*, 1961). In experimentellen Untersuchungen an Ratten zeigte sich, dass Neurone des posterioren Hypothalamus, v.a. des dorsomedialen Anteils (DMH), welche durch GABAerge warmsensitive Neurone der POA inhibiert werden, exzitatorische Signale für die Wärmebildung durch Muskelzittern generieren (Yoshida *et al.*, 2002) (Abb. 4). Retikulospinale Neurone der *Formatio reticularis* erhalten dabei ihrerseits synaptischen Input der DMH-intrinsischen

Neurone und senden efferente Signale, vermittelt über den *Tractus reticulospinalis*, über das Rückenmark vor allem an die Skelettmuskulatur der Extremitäten zur Modulation des Zitterns (Nagashima *et al.*, 2000).

Säugetierspezies verfügen über mehrere Möglichkeiten, auch ohne Muskelzittern den Stoffwechsel und damit die Wärmeproduktion des Organismus zu steigern. Neben einer Erhöhung der metabolischen Rate durch thyroideale Hormone (Silva, 1995) stellt vor allem die zitterfreie Thermogenese eine wichtige Möglichkeit der Wärmebildung dar. Die zitterfreie Thermogenese besteht vor allem in der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes (BAT) zahlreicher Nagetiere sowie der meisten Haustiere im frühen postnatalen Stadium, mit Ausnahme der Ferkel (Cannon *et al.*, 1998). Entstehung und Bedeutung der zitterfreien Thermogenese durch das BAT wurde vor allem am interscapulären Fett von Nagetieren untersucht. Die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien der Adipozyten führt zu einer Erwärmung des BAT und konduktiv / konvektiv des durchströmenden Blutes. Die dichte sympathische Innervation beeinflusst dabei über β_3 -Adrenozeptoren die Aktivität einer spezifischen Lipase zur Bereitstellung freier Fettsäuren, den mitochondrialen Gehalt an UCP₁ (uncoupling protein) -Kanälen für die Unterbrechung des Protonengradienten zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran sowie die Vasodilation im BAT (Cannon *et al.*, 1998). Prämotorische sympathische, im Bereich des *Raphe pallidus* lokalisierte, medulläre Neurone innervieren sympathische präganglionäre Neurone der intermediolateralen Zellsäule des thorakalen Rückenmarks, welche ihrerseits nach Umschaltung auf postganglionäre Neurone des *Ganglion stellatum* das interscapuläre BAT innervieren. Der *Raphe pallidus* wird vermutlich über pontine, inhibitorische Neurone, den dorsomedialen Hypothalamus, die mediale POA und Neurone des MnPO moduliert (Abb. 4) (Bamshad *et al.*, 1999; Dimicco & Zaretsky, 2007; Morrison, 2004; Morrison *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2003).

1.4.4.2. Wärmeabgabemechanismen

Physikalische Formen der Wärmeabgabe wie Konvektion, Konduktion oder Strahlung können von Mensch/Tier lediglich durch ein modifiziertes Verhaltens-

repertoire beeinflusst werden. Bei den regulatorisch kontrollierbaren Wärmeabgabemechanismen wird zwischen nicht-evaporativen Formen, wie der erhöhten kutanen Durchblutung, und evaporativen Formen, wie Transpiration, Hecheln oder Salivation unterschieden. Ratten, die einer Wärmebelastung ausgesetzt werden, aktivieren zunächst nicht-evaporative, und erst bei unzureichender Kühlleistung evaporative Wärmeabgabemechanismen (Morimoto *et al.*, 1998).

Die Vasodilatation peripherer Hautgefäße, wie z.B. der Schwanzarterie der Ratte oder der Ohrarterie des Kaninchens erhöht im Rahmen des äußeren Wärmestroms den Wärmetransfer über das Blut an die Umwelt. Die nervale Kontrolle der kutanen Durchblutung geht von einer Aktivierung spezifischer Neurone des zentralen Höhlengraus (PAG) auf Ebene der *Pons* durch warm-sensitive Neurone der POA aus. Gleichzeitig senden POA-Neurone inhibitorische Signale an die vasokonstriktorischen Neurone des ventralen *Tegmentum* (VTA) (Abb. 4) (Nagashima *et al.*, 2000). Die medullären prämotorischen Neurone, welche die sympathische Efferenz zur Regulation der kutanen Durchblutung des Rattenschwanzes (Raman *et al.*, 1983) und der Ohrarterien des Kaninchens beeinflussen, sind im *Nucleus raphe* lokalisiert, und werden auf noch unbekannte Weise von Neuronen des PAG und VTA innerviert (Abb. 4) (Kanosue *et al.*, 2001; Nagashima *et al.*, 2000; Ootsuka *et al.*, 2004).

Beispiele für evaporative Wärmeabgabemechanismen sind das thermoregulatorische Schwitzen bei Menschen, Rindern, Pferden, Antilopen und Kamelen (Kanosue *et al.*, 1990), das Hecheln bei Hunden, Kaninchen oder zahlreichen Vogelspezies (Berb, 1997) und erhöhte Salivation wie etwa bei Katze und Ratte. Da Ratten nicht schwitzen können, sind ihre evaporativen, thermoregulatorischen Effektororgane nicht die Schweiß- sondern die Speicheldrüsen (Stricker, 1971). Der Temperaturschwellenwert, bei dem diese evaporative Kühlung aktiviert wird, liegt etwa bei 39,4 - 40,4°C (Horowitz, 1983; Kanosue, 1986). Bei Ratten und Beuteltieren wie dem Känguru wurde beobachtet, dass der vermehrt produzierte Speichel über das Fell verteilt wird, was an Putzverhalten erinnert („grooming“). Die bei der Verdunstung des Speichels entstehende Kälte dient der Kühlung des Organismus. Die vermehrte Sekretion erfolgt durch die *Glandula submaxillaris* und *sublingualis*, die sowohl sympathisch als

auch parasympathisch innerviert werden (Stricker & Hainsworth, 1970). Die efferente nervale Konnektivität zwischen Hypothalamus und Speicheldrüsen wurde kürzlich durch den Einsatz der viralen Tracing Methode aufgeklärt. Hübschle und Mitarbeiter (1998) wiesen nach Applikation eines *Pseudorabies* Virus in die Speicheldrüsen und dessen neurotrophen, retrograden Transport eine Markierung erster Ordnung im *Nucleus salivatorius* der *Medulla oblongata*, eine Markierung zweiter Ordnung im PVN und dem lateralen Hypothalamus und

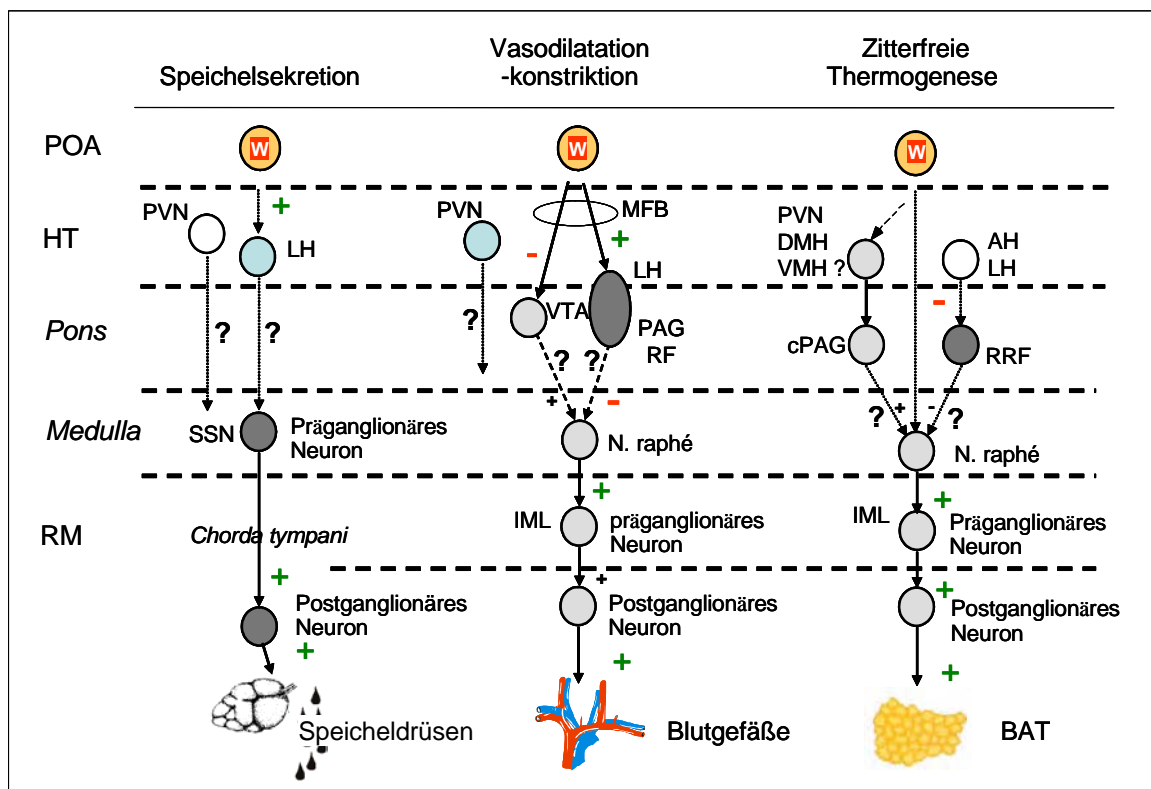


Abb. 4: Efferente neuronale Verbindungen von der präoptischen Region (POA) zu den thermoregulatorischen Effektororganen

Es sind die *dato* bekannten neuronalen Efferenzen für die Aktivierung der Speicheldrüsen (links) und des braunen Fettgewebes (rechts), sowie die Modulation des arteriolen Gefäßdurchmessers (mitte) im Rahmen der hypothalamischen Regulation der Körperkerntemperatur aufgezeigt. Erhöhte Speichelsekretion und Vasodilatation dienen der Wärmeabgabe; Vasokonstriktion, zitterfreie Thermogenese im braunen Fettgewebe und Muskelzittern (nicht dargestellt) dienen der Wärmeproduktion. (modifiziert nach Kanosue *et al.*, 2001).

Abkürzungen : AH = anteriorer *Hypothalamus*; DMH = dorsomedialer *Hypothalamus*; HT = *Hypothalamus*; IML = intermediolaterale Zellsäule; LH = lateraler *Hypothalamus*; cPAG = centrales, periaquäduktales Höhlengrau; MFB = mediales Vorderhirnbündel; POA = präoptische Region; PVN = *Nucleus paraventricularis hypothalami*; RF = RRF = *Formatio reticularis*; RM = Rückenmark; SSN = *Nuclei salivatorii*; VMH = ventromedialer *Hypothalamus*; VTA = ventrales *Tegmentum*

eine Markierung dritter bzw. vierter Ordnung in der medialen und lateralen POA, sowie Strukturen der *Lamina terminalis* (SFO, OVLT, MnPO) nach (Abb. 4). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die POA über warmsensitive Neurone die lokale Temperatur kontrolliert und efferente Signale an zahlreiche Stellglieder im Rahmen der Homöostase der Körperkerntemperatur sendet (Kanosue *et al.*, 1990, 2004).

1.5. Das nitrerger System des MnPO und der *Lamina terminalis*

Die Aktivierung spezifischer Neuronenpopulationen in den neuroglialen Strukturen der *Lamina terminalis* und der magnozellulären Kerngebiete durch osmotische Stimulationen bzw. Hypovolämie einerseits und spezifischer Neurone der POA, des MnPO und der LHA durch thermische Stimulationen andererseits führt unmittelbar zur Frage nach den jeweils beteiligten Transmittersystemen, welche vor allem im Bereich des MnPO an der Verarbeitung und Integration der afferenten Signale beteiligt sind. Die Entdeckung, dass Stickstoffmonoxid (NO) als flüchtiges Gas die Funktion eines Neurotransmitters im ZNS und peripheren Nervensystems besitzt, revolutionierte das Konzept neuronaler Kommunikation (Bredt & Snyder, 1994). So wurde neuronal synthetisiertes NO als Neuromodulator sowohl im Rahmen der zentralen Thermo- als auch Osmoregulation postuliert (Gerstberger, 1999; Kadekaro & Summy-Long, 2000; Simon, 1998). Zentral synthetisiertes NO ist darüber hinaus an der hypothalamischen Modulation des Fress- und Trinkverhaltens (Calapai *et al.*, 1992; Morley & Flood, 1992), der circadianen Rhythmik (Watanabe *et al.* 1995) oder des Schlafverhaltens (Kapas *et al.*, 1994) als volatiler Neuromodulator beteiligt.

NO wird durch eine Gruppe von Oxidoreduktasen, den sogenannten Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), synthetisiert. Dabei existieren vier Isoformen der NOS-Familie: die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die mitochondriale NOS (mtNOS). Letztere stellt eine Isoform der nNOS dar, die an der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert ist (Elfering *et al.*, 2002). Neuronale NOS und eNOS werden als Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Enzyme konstitutiv exprimiert (Mungrue *et al.*, 2003) und generieren NO über wenige Minuten. Im Gegensatz dazu erweist sich die iNOS

als Ca^{2+} -Calmodulin unabhängig und wird über *de novo* Synthese reguliert (Ebadi & Sharma, 2003). Ihre Expression wird durch immunologische oder inflammatorische Stimulation vorrangig in Makrophagen, Astrozyten oder Mikrogliazellen induziert, welche dann NO über mehrere Stunden bis Tage produzieren (Iadecola, 1995). Alle NOS Isoformen sind mit je vier prosthetischen Gruppen assoziiert: Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavin-Adenin-Mononucleotid (FMN), Eisen-Protoporphyrin IX (Häm) und Tetrahydrobiopterin (BH₄). FAD, FMN und Häm sind an der Redoxreaktion beteiligt. Häm und BH₄ bilden das molekulare Gerüst, welches den Substratkanal enthält (Mayer *et al.*, 1989; Tahey & Marletta, 1989; Weih *et al.*, 2003). Die NOS-Struktur besteht aus zwei Biodomänen (C- bzw. N-terminal), die unabhängig von einander arbeiten. Zum einen bindet die C-terminale Reduktase-Domäne Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH), FAD, FMN und Ca^{2+} -Calmodulin. Bei einer zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von über 400 nM/L bindet der Ca^{2+} - Calmodulin Komplex an diese Domäne und führt zu deren Öffnung, wodurch der Einstrom von Elektronen in das aktive Zentrum der NOS ermöglicht wird (Abu-Soud & Stühr, 1993; Esplugues, 2002). Die Erhöhung des intrazellulären Calciums kommt durch das Aktionspotential-bedingte Öffnen spannungsabhängiger Calciumkanäle zustande. Die N-terminale Domäne besitzt eine Oxygenase-Aktivität und bindet BH₄, Häm und L-Arginin (Stühr, 1999). Über eine Redoxreaktionskette (NADPH → FAD → FMN) werden in der Reduktase-Domäne Elektronen auf das Eisen des Häms übertragen, welches somit von Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird. Hier wird unter aeroben Bedingungen L-Arginin zu L-Citrullin und NO umgesetzt (Alderton *et al.*, 2001).

Die nNOS wird sowohl in undifferenzierten (Bredt, 1994) als auch reifen Neuronen exprimiert (Cork *et al.*, 1998). Des weiteren konnte nNOS in Astrozyten von Ratten (Arbones *et al.*, 1996), der *Adventitia* cerebraler Blutgefäße der Ratte (Nozaki *et al.*, 1993), cardialen und skeletalen Myozyten (Slivka *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1999), humanem Lungenepithel (Asano *et al.*, 1994), der renalen *Macula densa* (Tojo *et al.*, 1994) und der humanen Haut (Shimizu *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Für die nNOS lassen sich vier splice-Varianten unterscheiden (Lee *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Sowohl nNOS α als auch nNOS μ verfügen über eine PDZ-Domäne (PSD-95 discs large / ZO-1 homology

domain), welche an das PSD-95 (**p**ostsynaptic **d**ensity protein 95) oder PSD-93 bindet und somit eine Lokalisation an subzellulären Strukturen (z.B. Proteine des Zytoskeletts) aufweist, während den zytosolischen splice-Varianten nNOS β und nNOS γ diese PSD-Domäne fehlt. Glutamaterezeptoren des NMDA-Subtyps sind ebenfalls mit PSD-95 assoziiert (Kornau *et al.*, 1995), wodurch sich die Co-Lokalisation von nNOS und NMDA-Rezeptoren im zentralen Nervensystem erklären lässt (Bhat *et al.*, 1995). Die nNOS kann auch auf post-translationalem Niveau durch Phosphorylierung mittels Proteinkinasen und Calmodulin abhängigen Kinasen reguliert werden (Bredt & Snyder, 1994; Nakane *et al.*, 1991).

Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften kann NO nicht wie klassische Neurotransmitter bis zur Ausschüttung in synaptischen Vesikeln gespeichert bzw. durch Exozytose freigesetzt werden. Als volatiles Gas wird es erst nach exogener Aktivierung des generierenden Enzyms *de novo* synthetisiert und ist frei diffusibel. Neuronal produziertes NO erweist sich als äußerst kurzlebig (Krukoff, 1999; Lancaster, 1994) bei einer mittleren biologischen Halbwertszeit von 0,1 - 2 sec im extravaskulären Gehirnparenchym (Thomas *et al.*, 2001) bzw. 1,8 msec im Blut (Liu *et al.*, 1998). Die durch NO ausgelöste Signalkaskade erfolgt hauptsächlich über die Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase, welche die Umsetzung von Guanosin-Triphosphat (GTP) zum zyklischen Guanosin-Monophosphat (cGMP) katalysiert. Als intrazellulärer *second messenger* aktiviert cGMP nachfolgend beispielsweise die Proteinkinase G (Butt *et al.*, 1993) und Phosphodiesterasen (Ono & Trautwein, 1991), und nimmt somit indirekt Einfluss auf die Funktion von Ionenkanälen (Ahern *et al.*, 2002). Einen cGMP-unabhängigen Signalweg des NO stellt die S-Nitrosylierung als post-translationale Modifikation von Proteinen wie z.B. Ionenkanälen dar (Ahern *et al.*, 2002; Guix *et al.*, 2005). Sie erfolgt direkt über eine komplexe, chemische Reaktion ohne Beteiligung von Enzymen. In Lysaten von Gehirngewebe konnten, NO-vermittelt, insgesamt 15 S-nitrosylierte Proteine nachgewiesen werden (Jaffrey *et al.*, 2001). Auf Ebene der magnozellulären Neurone des PVN und SON aktivierte NO auf diese Weise Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle in der Neurohypophyse, wodurch die Impulsaktivität der Axonterminalen reduziert wurde, und NO somit eine inhibierende Wirkung auf die Sekretion von AVP ausübte (Kadekaro *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2007).

Unter pathologischen Bedingungen ist NO an der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen und ONOO- beteiligt. Aufgrund dieser Tatsache wird in der Produktion von NO im neurotoxischen Konzentrationsbereich und des daraus resultierenden oxidativen Stresses die Ursache für viele neurodegenerative Erkrankungen gesehen. So konnte eine ursächliche Verbindung erhöhter neuronaler NO-Synthese zu Erkrankungen wie z.B. Alzheimer, Parkinson, Huntington, amyotrophische Lateralsklerose und multiple Sklerose bereits aufgezeigt werden (Chabrier *et al.*, 1999).

Für die Ratte wurde die Expression der nNOS in nahezu allen Kerngebieten des Hypothalamus und der *Medulla oblongata* nachgewiesen, die an der Perception und Integration osmo-, volumen- und thermoregulatorischer Signale beteiligt sind. Hierzu zählen v.a. SFO, OVLT, MnPO, SON, PVN, die mediale POA, VMPO, AP, NTS und die ventrolaterale Medulla (Bhat *et al.*, 1995; Gerstberger, 1999; Gerstberger *et al.*, 2001; Iwase *et al.*, 1998; Jurzak *et al.*, 1994; Krukoff, 1999; Liu *et al.*, 1998; Maqbool *et al.*, 1995; Rodrigo *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999).

1.5.1. Physiologische Bedeutung des hypothalamischen NO für die Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes

Milde Dehydrierung für 24 Stunden sowie chronischer Trinkwasserentzug für 72 Stunden führten in den sensorischen CVOs (OVLT, SFO), MnPO, PVN und SON, nicht jedoch der POA, zu einer signifikanten Erhöhung der nNOS-intrinsischen NADPH-Diaphorase Aktivität, welche durch die Formazan-Reaktion im Gehirnschnitt sichtbar gemacht werden konnte (Ciriello *et al.*, 1996; Gerstberger *et al.*, 2001). Der Enzym-histochemische Nachweis der NADPH-Diaphorase Aktivität wurde dabei für Strukturen des zentralen Nervensystems mit dem Vorhandensein der nNOS gleichgesetzt (Dawson *et al.*, 1991). Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch Autoradiogramme an unfixierten Gehirnschnitten. Dehydrierung des Versuchstieres erhöhte die Bindungskapazität für den Radioliganden N^G-Nitro-L-[³H]Arginin in SFO, OVLT, PVN, SON und MnPO, jedoch nicht der POA (Gerstberger *et al.*, 2001). Nach chronischer Dehydrierung oder akuter

bzw. chronischer Salzbeladung stieg die Expression der nNOS-spezifischen mRNA in den MCNs des Hypothalamus signifikant an (Ciriello *et al.*, 1996; Kadowaki *et al.*, 1994; Villar *et al.*, 1994), teils einhergehend mit einer Zunahme der Anzahl NADPH-Diaphorase positiver Neurone in PVN, SON, MnPO und den beiden sensorischen CVOs der *Lamina terminalis* (Ciriello *et al.*, 1996; Ueta *et al.*, 1995). Nach i.p. Applikation von PEG führte die dadurch induzierte isotone und normotensive, intravasale Hypovolämie ebenfalls zu einer gesteigerten Expression der nNOS mRNA in SON und PVN der Ratte (Ueta *et al.*, 1998).

Die im Rahmen der zentralen Kontrolle des Salz- und Wasserhaushalts erhöhte Trinkwasseraufnahme nach Dehydrierung, exogener Salzbeladung, Hypovolämie oder erhöhten AngII Plasmawerten scheint zumindest teilweise durch intrahypothalamisch gebildetes NO vermittelt zu sein (Kadekaro *et al.*, 1994; Kadekaro & Summy-Long, 2000; Liu *et al.*, 1998; Zhu & Herbert, 1997). Die postulierte dipsogene Wirkung von NO wird unterstützt durch experimentelle Untersuchungen, in welchen die icv Applikation hoch affiner nNOS-Antagonisten bzw. nNOS mRNA-spezifischer Antisense-Oligodesoxynucleotide bei der wachen Ratte zu einer markanten Unterdrückung der durch icv AngII Mikroapplikation hervorgerufenen Trinkantwort führten (Hudl 2003). Administration eines nicht Subtyp-spezifischen NOS-Inhibitors in das ventrikuläre System des Rattengehirns verursachte zudem eine reduzierte Glukose-Utilisation im Bereich des MnPO und SFO, gleichbedeutend mit verminderter neuronaler Aktivität (Kadekaro *et al.*, 1994). Gegensätzliche Befunde wurden von Calapai und Caputi (1996) erhoben, wobei icv appliziertes L-Arginin zu einer Hemmung der durch zentrales AngII oder systemische Dehydratation stimulierten Trinkwasseraufnahme führte.

Hinsichtlich der neuromodulatorischen Bedeutung des hypothalamischen NO für die Synthese von AVP in MNCs des PVN/SON bzw. seine neurohypophysäre Freisetzung liegen zahlreiche, sich oft widersprechende Publikationen vor. Einige Arbeitsgruppen weisen für NO eine stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von AVP nach. So erhöhte die bei Ratten vorgenommene icv Applikation von S-Nitroso-N-Acetyl Penicillamin (SNAP), einem NO-Donor, den basa-

len AVP-Plasmaspiegel (Ota *et al.*, 1993). O`Shea und Gundlach (1996) stellten bei dehydrierten Ratten eine Zunahme der nNOS-Expression in den MCNs von PVN und SON, bei steigender AVP-Freisetzung, fest und setzten dies mit einer stimulierenden Wirkung von hypothalamischem NO auf die Aktivität der MCNs gleich (O`Shea, 2003). Vacher und Mitarbeiter (2003) zeigten durch *in vitro* Untersuchungen an hypothalamischen Gewebeschnitten der Ratte eine direkte Beteiligung der cGMP-abhängigen Signaltransduktion an der Regulation der AVP-Freisetzung. Durch Applikation des nNOS-Antagonisten L-NAME konnte dieser Signaltransduktionsweg inhibiert werden. Die Verabreichung von SNAP bzw. L-Arginin als endogenem Substrat der nNOS in den Bereich der AV3V-Region der Ratte löste einen Anstieg der neurohypophysären AVP-Freisetzung aus (Yamaguchi *et al.*, 2000).

Andere Arbeitsgruppen wiederum sprechen NO eine hemmende Wirkung auf die AVP-Freisetzung zu. Durch Versuche mit nNOS-knockout Mäusen konnte eine inhibierende Wirkung von NO auf die basale Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin nachgewiesen werden (Yamiva *et al.*, 2007). Die i.p. Applikation des nNOS-Inhibitors N- ω -Nitroarginin bewirkte eine Senkung des AVP-Plasmaspiegels (Kadowaki *et al.*, 1994). Liu und Mitarbeiter (1998) postulierten, dass NO unter normovolämischen, isotonen Zuständen die Freisetzung von AVP und OT unterbindet, während bei Dehydrierung die inhibierende Wirkung auf die AVP-Freisetzung nachlässt und die auf OT verstärkt wird. Ähnliche Effekte erzielte die Induktion einer Hypovolämie unter Einwirkung von AngII (Kadekaro & Summy-Long, 2000). Eine weitere Möglichkeit der Beteiligung von hypothalamischem NO an der Modulation der AVP-Sekretion besteht in der zellulären Interaktion des nitrergen mit dem noradrenergen Transmittersystem auf hypothalamischer Ebene. Mittels *in vitro* Versuchen gelang es, NA als wichtigen Regulator der AVP-Freisetzung zu identifizieren und für NO eine modulierende Funktion zu verifizieren (Kadekaro & Summy-Long, 2000). Aufgrund dieser vielfältigen Versuchsergebnisse scheint die Wirkung von hypothalamischem NO vom Applikationsort der Testsubstanz (NO-Donor, nNOS-Antagonist) sowie Zustand des Versuchstieres (Normovolämie, Hypovolämie, Isotonie, Hypertonie) abhängig zu sein.

1.5.2. Bedeutung des hypothalamischen NO für die Homöostase der Körperkerntemperatur

Exponiert man Ratten einer Umgebungstemperatur von 34°C für 48 Stunden, so resultierte dies in einem Anstieg der enzymatischen Aktivität der nNOS sowie Bindung des Radioliganden N^G-Nitro-L-[³H]Arginin in der medialen POA, VMPO, MnPO und eingeschränkt auch im OVLT, während in PVN, SON und SFO kein Aktivitätsanstieg dokumentierbar war (Gerstberger *et al.*, 2001). Aufgrund tierphysiologischer Studien liegen auch hinsichtlich der Rolle von intra-hypothalamisch gebildetem NO für die Homöostase der Körperkerntemperatur (KT) einige Veröffentlichungen vor, wobei auch hier grundsätzlich zwischen der peripheren und zentralen Wirkung der eingesetzten, NO-spezifischen Agenzien zu unterscheiden ist. Diese Erkenntnis basiert auf widersprüchlichen Ergebnissen nach systemischer (Branco *et al.*, 1997, 1998; de Luca *et al.*, 1995; de Paula *et al.*, 2000; Sammell *et al.*, 1996) bzw. intracerebroventrikulärer Applikation (Branco *et al.*, 1997; de Luca *et al.*, 1995; de Paula *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 1998) von Modulatoren des nitrogenen Signaltransduktionsweges. Desweiteren ist der thermische Zustand des Tieres (Normothermie, Hyperthermie, Fieber) von großer Bedeutung.

Im Zustand der Normothermie führte die icv Injektion des generellen NOS-Inhibitors L-NAME zu einem leichten Anstieg der KT, weshalb NO eine thermolytische Funktion zugesprochen werden könnte (Branco *et al.*, 1997; de Luca *et al.*, 1995; de Paula *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 1998). Auch die lokale Infusion eines NO-Donors in den dritten Hirnventrikel des Kaninchens induzierte Wärmeabgabemechanismen wie einen Anstieg der Ohrhauttemperatur aufgrund markanter Vasodilatation oder vermehrtes Hecheln und damit respiratorische, evaporative Wärmeabgabe, und bedingte somit eine Erniedrigung der Körperkerntemperatur (Eriksson *et al.*, 1997). Somit scheint NO unter normothermen Zuständen im Rahmen der homöostatischen Regulation einen senkenden Einfluss auf die KT auszuüben (Gerstberger, 1999; Simon *et al.*, 1998).

Fieber ist durch eine hypothalamische Sollwertverstellung und dem daraus resultierenden Anstieg der KT charakterisiert und kann durch eine Reihe von „Pathogen-assoziierten molekularen Mustern“ (PAMPS), wie z.B. Lipopolysac-

charid (LPS) Gram-negativer Bakterien, Membranbestandteile Gram-positiver Bakterien oder RNA-Fragmente einiger Viren ausgelöst werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen beeinhalteten nach heutigem Wissensstand die Induktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interferon und Tumornekrosefaktor α , wobei die Gruppe der Prostaglandine, v.a. Prostaglandin E₂, im ZNS eine nachgeschaltete, modulierende Funktion übernimmt (Roth *et al.*, 2006; Wuchert *et al.*, 2008). NO scheint ebenfalls an der pyrogen-induzierten, febrilen Antwort als hypothalamischer Neuromodulator beteiligt zu sein (Blatteis, 1998; Gerstberger, 1999; Kluger, 1991). Icv Injektionen eines NO-Donors in einer Konzentration, welche die Körperkerntemperatur eines euthermen Tieres nicht beeinflusst, bewirkte beim febrilen Kaninchen eine Antipyrese (Gourine, 1995). Mikroapplikationen des nicht-selektiven NOS-Antagonisten Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) in die anteroventrale, präoptische Region (AVPO) des Hypothalamus febriler Ratten (aufgrund einer systemischen LPS-Injektion) verstärkte die frühe Phase des LPS-Fiebers, während Mikroinjektionen eines NO-Donors bzw. von 8-Bromo-cGMP in die AVPO-Region zu einer Reduktion der KT führten. Dies deutete ebenfalls auf eine antipyretische NOerge Wirkung im Bereich des anterioren Hypothalamus hin (Steiner *et al.*, 2002). Für eine intrahypothalamisch-antipyretische Aktivität des NO sprechen ebenfalls Daten aus Arbeiten von Gourine (2000), der zeigen konnte, dass die icv Applikation eines NO-Donors die pyrogenen Effekte von IL-1 in der POA der Ratte kompensieren konnte. Andererseits beschrieben Amir und Mitarbeiter (1991) nach Applikation von L-NMMA in die POA die Attenuierung eines PGE₂-induzierten Fiebers. Neuere Untersuchungen anhand LPS-induzierten Fiebers und icv bzw. intrapräoptischer Applikation von L-NMMA bestätigten diese Ergebnisse (Begg *et al.*, 2007). Eine möglicherweise febrigene Aktivität wurde auch auf der Ebene lokaler NOerger Wirkung im Bereich des OVLT diskutiert (Lin & Lin, 1997). Unter Bedingungen eines Fiebers scheint zentralem NO jedoch in erster Linie eine thermolytische Wirkung zuzukommen.

1.6. Das noradrenerge System des MnPO und der *Lamina terminalis*

Neben NO stellt Noradrenalin (NA) einen wichtigen Neurotransmitter im Bereich der *Lamina terminalis* im Rahmen hypothalamischer Kontrollfunktionen zur Konstanzhaltung des Salz- und Wasserhaushaltes sowie des Kreislaufs, aber auch des Wärmehaushalts dar. NA wirkt über α 1-, α 2- und β -Rezeptoren (Bylund *et al.*, 1994), die alle zur Gruppe der transmembranalen, 7-helikalen Glykoproteine gehören. Die AV3V-Region wird afferent von catecholaminergen Zellgruppen des Hirnstammes innerviert (Lindvall *et al.*, 1974). Der MnPO als Strukturkomponente der AV3V-Region im Speziellen enthält Axonterminale der noradrenergen A1/2-Zellgruppen und der adrenergen C1/2-Zellgruppen der *Medulla oblongata* (Saper *et al.*, 1983). Nervenfasern immunpositiv für Dopamin- β -hydroxylase, einem Schlüsselenzym der NA-spezifischen Biosynthese, zeigten innerhalb der *Lamina terminalis* ein charakteristisches Verteilungsmuster mit ausgeprägter Innervation des OVLT, SFO sowie des MnPO (Abb. 5) (Zardetto-Smith & Gray, 1987; Zardetto-Smith *et al.*, 1993). Die Applikation von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) als catecholaminerges Neurotoxin in die AV3V-Region bewirkte die Destruktion ihrer catecholaminergen Innervation und führte zu ähnlichen Effekten auf die Homöostase des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes wie thermische Läsionsstudien in diesem Bereich. Hierzu zählten Adipsie sowie ein fehlender Blutdruckanstieg nach zentral appliziertem AngII bzw. eine abgeschwächte Induzierbarkeit experimenteller Hypertonie (Brody, 1980; Pickel & Chan, 1995).

Funktionelle Studien haben eine Aktivierung noradrenerger medullärer Neurone durch erniedrigten Blutdruck und Hypovolämie der EZF gezeigt (Quintin *et al.*, 1987), was darauf hindeutete, dass beide Signale der EZF aufsteigende, noradrenerge Projektionen aktivierten und zu einer synaptischen Freisetzung von NA in der *Lamina terminalis* führten (Johnson, 1985). Diese Annahme wurde durch Studien belegt, in denen eine Reduktion des EZF-Volumens zu einer erhöhten NA-Konzentration im Bereich des SFO (Tanaka *et al.*, 1998) und einem gesteigerten NA-Turnover im MnPO führte (Wilkin *et al.*, 1987). Injektionen von NA direkt in den MnPO verursachten einem Anstieg des arteriellen

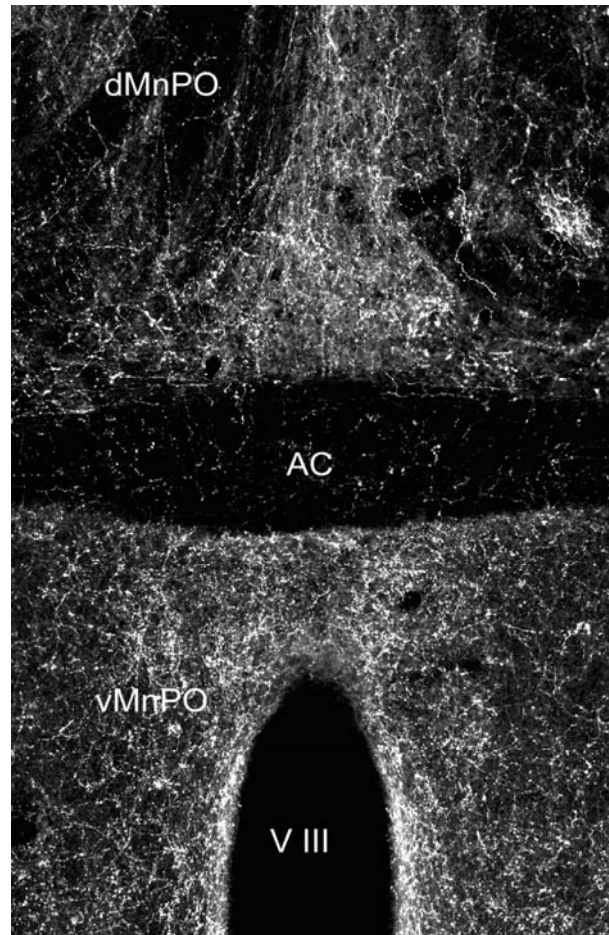


Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis der Dopamin- β -hydroxylase im dorsalen und ventralen Anteil des MnPO

Anhand dieser Übersichtsaufnahme des dorsalen (d) und ventralen (v) MnPO ist die ausgesprochen dichte Verteilung noradrenerger Nervenfasern und synaptischer Boutons zu erkennen. Der immunhistochemische Nachweis des Schlüsselenzyms Dopamin- β -hydroxylase in diesem hypothalamischen Kerngebiet erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Benutzung eines polyklonalen primären Antiserums aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:1000). Versuchsdurchführung siehe Material-Methoden Teil Kap. 2.4.5.

AC = *Commissura anterior*; V III = dritter Hirnventrikel; vMnPO = ventraler MnPO; dMnPO = dorsaler MnPO

Blutdrucks mit assoziierter Bradycardie (da Silva *et al.*, 1995). Die NA-Freisetzung aus Projektionen des Hirnstamms (NTS) erfolgte dabei umgekehrt proportional zur Aktivität systemischer Volumen-/Druckrezeptoren (Wilkin *et al.*, 1987). Die Inaktivierung der A1-Zellgruppe durch lokale Applikation von Lidocain reduzierte die Freisetzung von NA im MnPO bei durch Hämorrhagie bedingter Hypovolämie. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die medulläre, noradre-

nerge Innervation des MnPO eine wichtige Rolle im Rahmen der Homöostase des kardiovaskulären Systems spielt (Tanaka *et al.*, 2002).

In anderen Studien wurde dagegen eine Hemmung der stimulierten NaCl- und Wasseraufnahme durch in den dritten Hirnventrikel injiziertes NA festgestellt, was auf eine in der Fachliteratur vorherrschende Diskrepanz bezüglich gegensätzlicher Wirkungen des noradrenergen Systems hinweist. Die hemmende, noradrenerge Modulation der Renin-vermittelten NaCl- und Wasseraufnahme, sowie der unstimulierten und durch NaCl-Entzug induzierten NaCl-Aufnahme konnte auf eine α_2 -spezifische Rezeptorinteraktion von präoptisch wirkendem NA zurückgeführt werden (de Paula *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 1999). Dies stimmt mit den Untersuchungen in anderer Regionen wie dem medialen Septum und lateralen Hypothalamus überein (Ferrari *et al.*, 1997; Yada *et al.*, 1997). Andererseits wurde im SFO und der medialen POA der Ratte die Beteiligung von β -Rezeptoren an der AngII vermittelten Trinkantwort gezeigt (Bastos *et al.*, 1994; Saad *et al.*, 1985). Das noradrenerge System scheint also über α_2 -Rezeptoren eine Hemmung und über β -Rezeptoren eine Stimulation der NaCl- und Wasseraufnahme in Strukturen der *Lamina terminalis* sowie der POA zu bewirken. Untersuchungen von da Silva *et al.* (1995) zeigten dagegen, dass im MnPO α_1 - und α_2 -Rezeptoren, nicht aber β -Rezeptoren, die AngII-induzierte Trinkantwort vermitteln bzw. modulieren. So wurde nach Hemmung α -adrenerger Rezeptoren im PVN eine verringerte Trinkantwort auf in das SFO-injiziertes AngII beobachtet (Tanaka, 2002). Die Aktivierung adrenerger Rezeptoren moduliert darüber hinaus die durch zentrales AngII induzierte Natrium-, Kalium- und Urinausscheidung der Nieren, welche durch zentrale Blockade β -adrenerger Rezeptoren gesteigert und Hemmung α_1 - und α_2 -adrenerger Rezeptoren reduziert wurde (Silva *et al.* (1995).

In der 1960er bis 1980er Jahren wurde die These der noradrenergen Modulation der hypothalamischen Temperaturregulation, möglicherweise durch Beeinflussung des Sollwertes direkt oder der Schwellenwerte für die Aktivierung vor allem der Kälteabwehrmechanismen, diskutiert (von Euler, 1961). NA sollte dabei einen Gegenspieler zu Serotonin als weiterem biogenen Botenstoff darstellen. Mikroinjektionen beider Transmitter in den medianen Bereich des Hypo-

thalamus, nicht jedoch offensichtlich die POA selbst (Roth *et al.*, 2001), beeinflussten die Körpertemperatur antagonistisch bei mehreren Spezies (Blatteis, 1981; Brück, 1980; Feldberg, 1963; Hellon, 1975). Die stereotaktische Applikation von NA in den medialen Hypothalamus von Meerschweinchen etwa steigerte die Wärmeproduktion und verschob die Zitterschwelle zu Werten einer höheren mittleren Körpertemperatur (Zeisberger *et al.*, 1971, 1987). Vergleichbare thermogenetische Reaktionen waren auch nach elektrischer Stimulation lateral-medullärer Hirnstammregionen im wachen Meerschweinchen erzielt worden (Szeleny, 1977). Neuere Studien zur Verifizierung der modulatorischen Potenz noradrenerger Afferenzen auf die Entladungsrate thermosensitiver POA-Neurone wurden an Urethan-anästhetisierten Ratten durchgeführt. Dabei verursachten die mikroiontophoretischen Injektionen des α 1-spezifischen Antagonisten Prazosin in the POA eine Hemmung warm-, kalt- sowie Temperaturinsensitiver Nervenzellen, wodurch die antizipierte These einer ausgeprägten Bedeutung der noradrenergen Innevation für die zentrale Thermoregulation - entgegen der Meinung der Autoren - nicht unterstützt werden konnte (Mallick *et al.*, 2002). Andererseits wird NA als wesentlicher, terminaler Neurotransmitter im Rahmen der Fieberantwort auf Ebene der POA angesehen, und heute kann in der POA synaptisch freigesetztes NA als wichtiger Mediator für die durch PAMPs oder Zytokine initiierte Fieberantwort klassifiziert werden (Feleder *et al.*, 2004, 2007; Roth & Zeisberger, 2001).

1.7. Das intracerebrale Renin-Angiotensin System (cRAS)

Einen weiteren wichtigen Neurotransmitter, der an der hypothalamischen Kontrolle sowohl der Osmo- und Volumen- als auch Thermoregulation beteiligt ist, stellt Angiotensin II (AngII) dar. Die Biosynthese des neuroaktiven AngII erfolgt über die C-terminale Hydrolyse des Vorstufenmoleküls Angiotensinogen durch die Aspartat-Protease Renin zum Dekapeptid Angiotensin I, welches durch das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) zum Oktapeptid AngII hydrolysiert wird. Dieser Syntheseweg gilt sowohl für peripher als auch zentral gebildetes AngII. Im Gehirn existiert neben dem klassischen Weg eine direkte Umwandlung von Angiotensinogen zu AngII durch Enzyme wie Cathepsin G oder Tonin (Lippoldt *et al.*, 1995). Aminopeptidasen (A und N) konvertieren AngII zu seinen ebenfalls

neuroaktiven Fragmenten AngIII und AngIV (Mentlein & Ross, 1996), die Carboxypeptidase P generiert aus AngII das neuroaktive Fragment Ang(1-7) (von Bohlen und Halbach & Albrecht, 2006). Alle Komponenten des RAS, wie Enzyme, Vorstufenmoleküle zur Synthese und Degradation von Angiotensin sowie spezifische Rezeptoren konnten im Gehirn sowohl in Strukturen innerhalb als auch außerhalb der BHS identifiziert werden (Lenkei *et al.*, 1997; Muratani *et al.*, 1996). Erste Hinweise darauf erbrachten Ganten *et al.* (1971) durch die biochemische Charakterisierung eines Renin-ähnlichen Enzymes im Gewebe des caninen *Nucleus caudate*, wobei eine bilaterale Nephrektomie (peripherer Syntheseort von Renin) die zentrale Reninkonzentration nicht beeinflusste. Der Nachweis von zentralem Renin, Angiotensinogen und AngII erfolgte auf Proteinebene durch Radioimmunoassay und Immunzytochemie, auf entsprechender mRNA Ebene durch molekularbiologische Methoden (Bunnemann *et al.*, 1992; Calza *et al.*, 1982; Dzau *et al.*, 1986; Ganten *et al.*, 1971; Phillips *et al.*, 1979; Sernia, 1997). Somit stellt das Gehirn-intrinsische Renin-Angiotensin System (cRAS) ein zum peripheren RAS analoges, möglicherweise unabhängiges System dar (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

AngII wirkt über spezifische membranständige Rezeptoren, die in Losartan-sensitive AT₁- und PD123319-sensitive AT₂-Rezeptoren eingeteilt werden (Bumpus *et al.*, 1991). Es handelt sich dabei um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Die Bindung des Peptids an AT₁-Rezeptoren führt über Aktivierung der Phospholipase C zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1991). Autoradiographische Bindungsstudien zeigten eine vor allem auf hypothalamische und medulläre Strukturen beschränkte Verteilung dieser Rezeptoren im Gehirn vieler Säuger einschließlich des Menschen (Barth & Gerstberger, 1999; Gehlert *et al.*, 1985; Horowitz *et al.*, 1999; McKinley *et al.*, 1987; Mendelsohn *et al.*, 1984). Radioliganden-Bindungsstudien mit AT₁- und AT₂-spezifischen Antagonisten, Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung ergaben für die hypothalamischen und medullären Strukturen eine Dominanz des AT₁-Rezeptors (Bunnemann *et al.*, 1992; Lenkei *et al.*, 1997; Muratani *et al.*, 1996; Rowe *et al.*, 1990; Song *et al.*, 1992). Die höchste Dichte an AT₁-Rezeptoren wiesen dabei

Strukturen mit Bedeutung für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes auf. Dazu zählen v.a. SON, PVN, SFO, OVLT, MnPO, NTS und VLM.

Kombinierte immunhistochemische Tracingstudien zeigten, dass Neurone des SFO angiotensinerge Fasern in den MnPO entsenden (Lind *et al.*, 1985). Im Rahmen einer Hypovolämie oder Hyponatriämie der EZF aktiviert zirkulierendes AngII aufgrund der fehlenden Blut-Hirn Schranke SFO-intrinsische Neurone, die ihrerseits offensichtlich über efferente Konnektivitäten mit AngII als Neurotransmitter diese Information an den MnPO weiterleiten (McKinley *et al.*, 1996; Thunhorst *et al.*, 1997). Bei Nagern konnte der AT₁-Rezeptor darüber hinaus pharmakologisch in die Subtypen AT_{1A} und AT_{1B} differenziert werden (Iwai & Inagami, 1992; Sandberg *et al.*, 1992). Durch *in situ* Hybridisierung konnte eine hohe Konzentration der AT_{1A}-Rezeptor mRNA in SFO, OVLT, MnPO und PVN nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass der angiotensinerge Einfluss auf cardiovaskuläre Funktionen und die Wasser- und Elektrolythomöostase durch diesen Rezeptorsubtyp vermittelt wird (Lenkei *et al.*, 1995). So konnte nach einem 48-stündigen Wasserentzug im SFO eine geregelte Überexpression der Angiotensinogen- und AT_{1A}-Rezeptor-spezifischen mRNAs dokumentiert werden (Barth & Gerstberger, 1999). Die Zelltyp-spezifische Biosynthese bzw. Lokalisation einzelner Komponenten des cRAS ist Gegenstand laufender Forschung (Brenner, 2002; von Bohlen und Halbach & Albrecht, 2006). Co-Lokalisation von Angiotensinogen mit glial fibrillary acidic protein (GFAP), einem Glia-spezifischen Strukturprotein, führte zur Vermutung, dass vornehmlich Astrozyten Angiotensinogen exprimieren. (Deschepper *et al.*, 1986; Stornetta *et al.*, 1988). Andere Studien wiesen die Expression des Angiotensinogens sowohl in Astrozyten als auch Neuronen nach (Imboden *et al.*, 1987; Sernia *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999). Es ist nicht geklärt, ob AngII intrazellulär in Neuronen gebildet wird oder extrazelluläres Angiotensin I durch ACE konvertiert und das somit entstehende AngII neuronal aufgenommen wird (Brenner, 2002; Deschepper *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1979; Saavedra & Chevillard, 1982).

Ablationsstudien der AV3V-Region bei der Ratte führten zu einer Suppression von AngII-induziertem Trinkverhalten (Buggy & Fischer, 1976), und es konnte

nachgewiesen werden, dass vor allem im MnPO lokalisierte AT₁-Rezeptoren diese Trinkantwort vermitteln. So bewirkte direkt in den MnPO appliziertes AngII eine gesteigerte Trinkwasseraufnahme (O'Neill & Brody, 1987), welche durch eine zuvor durchgeführte, stereotaktische Ablation des MnPO vollkommen unterbunden werden konnte (Cunningham *et al.*, 1992). Als Anzeichen einer direkten Aktivierung MnPO-intrinsischer Neurone konnte gezeigt werden, dass icv Mikroinjektionen von AngII eine c-fos Expression in zahlreichen Neuronen des MnPO induzierten (Gerstberger *et al.*, 2001; Herbert *et al.*, 1992; McKinley *et al.*, 1995). Elektrophysiologische *in vitro* Untersuchungen an hypothalamischen Gehirnschnittpräparationen der Ratte schließlich ergaben, dass superfundiertes AngII zu einem transienten Einwärtsstrom im voltage-clamp Modus sowie einer Depolarisation im current-clamp Modus bei mehr als 50 % der MnPO Neurone führte (Bai & Renaud, 1998). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass systemisches oder intracerebroventrikuläres AngII nur bei intaktem MnPO dipsogen wirken konnte, Läsionen des SFO alleine dagegen die Trinkantwort nach zentral applizierten AngII nicht zu blockieren vermochten (Lind & Johnson, 1981). Nach Kainat-Säure bedingter Zerstörung des PVN konnte die Trinkantwort nach Applikation von AngII in das SFO unterbunden werden (Gutman *et al.*, 1988). Durch Kenntnis der efferenten Projektionen des MnPO zum PVN zeigten elektrophysiologische Studien, dass AngII-sensitive MnPO-Neurone die Aktivierung des SFO-intrinsischen RAS an den PVN übermitteln und somit das Trinkverhalten mediierten (Stocker & Toney, 2007; Tanaka *et al.*, 1993). Elektrolytische Läsionen des MnPO führten zu einer Hemmung der pressorischen Antwort auf zentral sowie peripher verabreichtes AngII (O'Neill & Brody, 1987). Die Rolle des RAS als Mediator der Trinkwasseraufnahme nach PEG-induzierter Hypovolämie zeigte sich auch unter Blockade des ACE. Die Verabreichung der ACE-Hemmstoffe Captopril und Enalapril, und die damit reduzierte AngII-Bildung, führte zu einem antidipsogenen Effekt bei hypovolämischen Tieren (Mann *et al.*, 1988).

Weiterhin gibt es Hinweise auf die Beteiligung des hypothalamischen RAS an der zentralen Kontrolle der Thermoregulation. AngII-positive Zellkörper und die Expression des AT₁-Rezeptors konnten in thermoregulatorischen Kerngebieten des Hypothalamus auf beiden Seiten der BHS dargestellt werden (Lenkei *et al.*,

1997; Lind *et al.*, 1985). Zentral wirkendes AngII verbesserte die kutane, evaporative Wärmeabgabe über den Schwanz der Ratte (Wilson & Fregley, 1985) und verstärkte bei peripherer Wärmebelastung (Kregel *et al.*, 1994) bzw. Erhöhung der intrahypothalamischen Temperatur (Keil *et al.*, 1994) die Freisetzung des AVP aus der Neurohypophyse von Ratte respektive Kaninchen. Die zentrale Injektion des AT₁-Rezeptorblockers Losartan bei Ratten unter Bedingungen eines externen Hitzestresses hatte eine ausgeprägtere Zunahme der Körperkerntemperatur als bei Kontrolltieren mit Injektion steriler, künstlicher Liquorflüssigkeit alleine zur Folge (Mathai *et al.*, 2000). Vergleichbare Daten konnten auch für Ratten während Laufrad-Aktivität mit Belastungs-induzierter Hyperthermie verzeichnet werden (Leite *et al.*, 2006). Horowitz und Mitarbeiter (1999) zeigten darüber hinaus, dass die icv Mikroapplikation von Losartan den Temperaturschwellenwert für die periphere Vasodilatation anzuheben und denjenigen für die evaporative Wärmeabgabe während Hitzestress zu senken vermochte. AngII scheint als intrahypothalamischer Neurotransmitter also periphere Wärmeabgabemechanismen bei Hyperthermie unterschiedlicher Genese zu stimulieren.

Noradrenalin und Angiotensin II interagieren als Neurotransmitter auf hypothalamischer Ebene im Rahmen der Homöostase von kardiovaskulärem System sowie Wasser- und Elektrolythaushalt, wie durch chemische Läsionen des NAergen Transmittersystems in der *Lamina terminalis* angedeutet wurde. So bewirkten Mikroapplikationen von 6-Hydroxydopamin in MnPO und OVLT infolge einer verminderten NA-Konzentration in diesen Kerngebieten eine Störung der Tränkeaufnahme und eine reduzierte pressorische Antwort auf icv verabreichtes AngII (Bellin *et al.*, 1987; Cunningham & Johnson, 1989; Cunningham *et al.*, 1991). Eine intakte, noradrenerge Innervation des MnPO scheint somit essentiell sowohl für die/das durch AngII induzierte pressorische Reaktion und Trinkverhalten, als auch für die Vasopressinsekretion zu sein (Cunningham *et al.*, 1991; Eng & Miselis, 1981; Lind & Johnson, 1982; Mangiapane *et al.*, 1983; Miselis, 1981). Es wurde postuliert, dass AngII aufgrund seiner Interaktion mit NA hier als Neuromodulator fungiert. Eine Injektion des α -Adrenozeptor spezifischen Antagonisten Phentolamin in den Bereich des MnPO bewirkte eine Verminderung der im SFO durch zirkulierendes AngII vermittelten Trinkantwort bei

Ratten (Tanaka *et al.*, 2002). Auch bei der durch zentrales AngII induzierten Natriurese, Kaliurese und Diurese ist NA als wesentlicher Transmitter beteiligt (da Silva *et al.*, 1995). Es wird postuliert, dass angiotensinerge Nervenendigungen über präsynaptische AT₁-Rezeptoren die vesikuläre Freisetzung von NA aus medullären Afferenzen bewirken, welches seinerseits über α -Adrenozeptoren AngII-vermittelte Effekte moduliert.

1.8. Ziele der wissenschaftlichen Arbeit

Das erste Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist die Untersuchung der hypothalamischen Kontrollfunktion des Wasser-, Elektrolyt- und Wärmehaushaltes bei der wachen Ratte unter besonderer Beachtung der in der *Lamina terminalis* gelegenen neuroglialen Strukturen des *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO). Hierfür bedarf es der Etablierung von telemetrischen Versuchsmodellen, welche die spezifische Beeinflussung des thermo- und/oder osmoregulatorischen Regelkreises durch (1) milde Dehydratation, (2) isotone extrazelluläre Hypovolämie, (3) milde Wärmeexposition sowie (4) Hitzestress der Versuchstiere ermöglichen. Es erfolgt ein Computer-gestütztes on-line Monitoring wichtiger Vitalfunktionen der beiden Regelkreise (zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur, der lokomotorischen Aktivität und der Trinkwasseraufnahme), sowie eine off-line Erfassung basaler Parameter der extrazellulären Körperflüssigkeit (Blut-Hämatokrit, Osmolalität und Natriumkonzentration des Plasmas), um die Spezifität der jeweiligen thermischen oder osmotischen/Volumen- Stimulation beurteilen zu können.

Als zweites Ziel soll unter Verwendung immunhistochemischer Methoden an fixierten Gehirnschnitten der Ratte der Nachweis spezifischer neuronaler Aktivierungsmuster in hypothalamischen Kerngebieten, vorrangig dem MnPO und OVLT, unter den Versuchsbedingungen (1) – (4) erbracht werden. Dazu wird die zellulär quantifizierbare nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors Fos als etabliertem neuronalen „Aktivitätsmarker“ herangezogen. Der kombinierte zelluläre Nachweis des nukleär lokalisierten Phosphoproteins Fos sowie der zytoplasmatischen neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) in MnPO und OVLT des Rattenhypothalamus soll eine Aussage über die Bedeu-

tung von Stickstoffmonoxid (NO) als wesentlichem Neurotransmitter/-modulator im Rahmen hypothalamischer Kontrollfunktionen für Körperkerntemperatur und Homöostase der extrazellulären Körperflüssigkeit ermöglichen.

Das dritte Ziel besteht in der experimentellen Analyse der efferenten Projektion osmotisch durch Trinkwasserentzug im wachen Tier aktivierter, MnPO-intrinsischer (nitrerger) Neurone in den parvozellulären Anteil des hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (pPVN) als wichtigstem hypothalamischen „Integrator“ afferenter Signalinformation. Dazu wird ein retrograd axonal transportierter Tracer (true blue =TB) in einem stereotaktischen Eingriff direkt in the pPVN narkotisierter Versuchstiere mikroappliziert. Nach optimiertem Zeitverlauf erfolgt in fixierten Gehirnschnitten der kombinierte, (immun-)histologische Nachweis für transportiertes TB, nukleäres Fos und zytosolische nNOS in Neuronen des MnPO.

Noradrenalin (NA) aus medullären Kerngebieten sowie Angiotensin II (AngII) aus Neuronen circumventrikulärer Strukturen repräsentieren wichtige Neurotransmitter im Rahmen der zentralnervösen Kontrolle des Wasser-, Elektrolyt- und Wärmehaushalts sowie der Volumenregulation auf der Ebene des MnPO. Als viertes Ziel der experimentellen Arbeit soll daher in einer neuroglialen Primärkultur des MnPO neonataler Ratten *in vitro* die durch NA oder AngII in Neuronen (nNOS-positiv *versus* –negativ) und Astrozyten induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) („calcium signalling“) untersucht werden. Dazu wird eine pharmakologische Charakterisierung der NA-spezifischen Rezeptoren mittels Einsatzes spezifischer Agonisten und Antagonisten angestrebt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Autoklav Systec 2540 EL (Systec, D-Wettenberg)

Computer: IBM kompatible Pentiumrechner

Dampfdruck - Osmometer Vapor pressure 5500 (Wescor Inc., Logan, UT, USA)

Flammenphotometer 943 (Instrumentation Laboratory, Lexington, KY, USA)

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, D-Hamburg)

mit digitaler schwarz-weiß Kamera (Spot Insight, Diagnostic Instruments -

Visitron Systems, D-Puchheim) und dazu gehöriger Spot Insight

Software, (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA)

Metamorph, Version 5.05 (Diagnostic Instruments - Visitron Systems,
D-Puchheim)

Gefrier - Microtom Modell 1205, (Jung, D-Heidelberg)

Hämatokritzentrifuge , Mikrofuge II, (Haereus, D-Heidelberg)

Heißluftsterilisator ED 115/E2 (Binder GmbH, D-Tuttlingen)

Mikrospektrofluorimetrisches Imaging System Till Vision (Till Photonics,
D-Gräfelfing) bestehend aus:

Imago-Photonics Kamera S/N 380KL0423 (Till Photonics, D-Gräfelfing)

Mikroskop Olympus BX50WI 2 (Olympus Optical, D-Hamburg)

Durchlichtregler Olympus TH3 (Olympus Optical, D-Hamburg)

Monochromator und Polychrome II (Till Photonics, D-Gräfelfing)

Software: Till Vision Version 3.0 (Till Photonics, D-Gräfelfing)

Zellkultur-Messkammer (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

pH-Meter 765 Calimatic (Kleinfeld Labortechnik, D-Hannover)

Microflow Biological Safety Cabinet (Thermo Electrocorporation,
D-Langenselbold)

Reinstwassersystem Milli-Q Biocel (Millipore, D-Eschborn)

Schermaschine (Aesculap, D-Tuttlingen)

Schlauchpumpen Minipuls-2 und Minipuls-3 (Abimed Analysen Technik,
D-Langenfeld)

Schüttler Typ 3011 (Roth, D-Karlsruhe)

Sicherheits-Bunsenbrenner (Fireboy) (Technomara, D-Fernwald)

Stereotaktisches Mikroapplikationssystem bestehend aus:

Stereotakter Model 900 (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)

Micropipette Puller PC-10 (Narishige, Tokio, Japan)

Binokkular Stemi SV8 (Zeiss, D-Oberkochen)

Pulsgenerator und Pressure Unit „Ionophor“ (Harvard Apparatus, D-March Hygsetten)
Schwanenhalslampe Intralux 500 (Volpi AG, Zürich, Schweiz)
Surgical Bone Drill System (Harvard Apparatus, D-March Hygsetten)
Wärmematte TR-100 FST+EA4013 (Messmer Elektronik, D-Dettenhausen)
Thermoblock QBT (VWR, D-Darmstadt)
Tier-Telemetriesystem bestehend aus:
 Klimakammer des Typs 10`US/+5 to +40 DU (Firma Weiss Umwelttechnik, D-Reiskirchen) bestehend aus:
 6 x Empfängerplatte RA -1000 (Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA)
 6 x Käfige 30 x 24 x 22,5 cm (L x H x B) (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)
 DP-24 Dataport (Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA)
 Sender VM-FH TR-3000 (Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA)
 Waagen (Accu Scan Instruments, Columbus, OH, USA)
 Software:
 Accudiet 1.20, (AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA)
 Dataquest IV, (Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA)
 Vitalview, Version 3.1, (Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA)
Tischrühr- und Heizgerät Combimag (Roth, D-Karlsruhe)
Transkardiale Perfusionsapparatur (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)
Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin, D-Berlin)
Vakuumpumpe XF 54 230 50 (Millipore, D-Eschborn)
Waagen: P1210N und AE 50 PM 2500 (Mettler Toledo, D-Gießen)
Wärmeschrank, Typ 5050 EK (Haereus, D-Hanau)
Wasserbad BF 15 (Renner GmbH, D-Dannstadt)
Zentrifuge MicroV, (Fisher Scientific, D-Schwerte)

2.1.2. Gebrauchsmaterial

Computerprogramme:

 Adobe Photoshop, Version 7.0 (Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim)
 Graph Pad Prism[®], Version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)
 Windows Microsoft Word, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)
 Windows Microsoft Excel, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

Glasgefäß Durchmesser 15 cm mit Polycarbonateinsätzen (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Hawksley Micro-Haematocrit Reader (Hawksley & Sons, London, UK)

Objektträgermappen (MAGV, D-Rabenau)

Operationsbesteck (Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen)

Pinsel (Rotmarderhaar) (Renensis, D-Flensburg)

Pipetten (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 100-1000, 10-100, 2-10, 0,5-2 µl)
(Eppendorf AG, D-Hamburg)

Spatel (Roth, D-Karlsruhe)

Tierkäfige:

transparente Typ IV Polycarbonat-Käfige

(38 x 59 x 18 cm / B x T x H) (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH,
D-Emmerdingen)

transparente Typ III Polycarbonat-Käfige

(28 x 42 x 15 cm / B x T x H) (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH,
D-Emmerdingen)

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Deckgläschen 15 x 15 mm Stärke 1 (für Zellkultur) (Menzel GmbH,
D- Braunschweig)

Deckgläschen 24 x 60 mm Stärke 1 (für Immunhistochemie) (Menzel GmbH,
D-Braunschweig)

Einmalkanülen Sterican® 0,9 x 40 mm, 20 G (Braun, D-Melsungen)

Einstreu für Tierkäfige: Altromin Animal-Bedding (Altromin GmbH und Co KG,
D-Lage-Lippe)

Einwegspritzen BD Plastipak (Becton-Dickinson, D-Heidelberg)

Faden Surgicryl, 3 metric, (SMI AG, D-Hünningen)

Faltenfilter 604 1/2 (Ø 240 mm), (Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel)

Flexiperm®-Mikro-12 Kammersysteme (Haereus, D-Hanau)

Glaskapillaren GB150-8P Borosilikat (Ø 1,3 mm, Länge 8 cm) (Science
Products GmbH, D-Hofheim)

Klingen für Aesculap-Rasiermesser (Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen)

Objektträger 76 x 26 mm (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Parafilm® (Roth, D-Karlsruhe)

Petrischalen (Plastik), 94/16 mm (Sarstedt, D-Nümbrecht)

Petrischale (Glas), Ø 11 cm (MAGV, D-Rabenau)

pH-Indikatorpapier (Merck, D-Darmstadt)

Reaktionsgefäße 0,5 1,5 2 und 5 ml (Eppendorf AG, D-Hamburg)

Röhrchen, steril, 15 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht)
Serologische Pipetten 1, 5 und 10 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht)
Sterikan-Indikatorband (MAGV, D-Rabenau)
Teflonschläuche (Ø 0,75 und 1,98 mm) (Kronlab, D-Sinsheim)
Tierfutter: Zucht-Diätfutter (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe)
Tupfer 15,2 cm (MAGV, D-Rabenau)
Tygon®-Schläuche (für Perfusionspumpe), Größe 0.110 und 0.081
(Abimed Analysen Technik, D-Langenfeld)

2.1.4. Chemikalien

Äthanol, vergällt (Schmidt, D-Dillenburg)
Äthanol, unvergällt (Merck, D-Darmstadt)
Angiotensin II (AngII) (Sigma Aldrich, D-München)
Antikörper:

Primäre Antikörper:

Mouse-anti-nNOS (Santa Cruz, D-Heidelberg)
Rabbit-anti-nNOS (Santa Cruz, D-Heidelberg)
Rabbit-anti-Fos (Santa Cruz, D-Heidelberg)
Mouse-anti-MAP (2a+2b) (Sigma Aldrich, D-München)
Goat-anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (DAKO Glostrup, DK)
Rabbit-anti- α 1-adrenergic-receptor (Abcam, Cambridge, UK)

Sekundäre Antikörper:

Alexa®488- donkey-anti-goat IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)
Alexa®488- donkey-anti-rabbit IgG (H+L) (MoBiTec GmbH,
D-Göttingen)
AMCA-donkey-anti-mouse IgG (H+L) (Dianova, D-Hamburg)
Cy3™- donkey-anti-rabbit IgG (H+L) (Dianova, D-Hamburg)
Cy3™- donkey-anti-mouse IgG (H+L) (Dianova, D-Hamburg)
Biotin-donkey-anti-rabbit IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlingame,
CA, USA)

Avidin-Biotin- Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
B 27 (Gibco, D-Karlsruhe)
Bepanthen Augensalbe (Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen)
Calciumchlorid (CaCl₂) (Merck, D-Darmstadt)
Carbogen (Messer Griesheim GmbH, D-Neuried)
CELLocate® glass coverslips (Eppendorf, D-Hamburg)
Chromalaun (Merck, D-Darmstadt)
Citifluor® (Cityfluor LTD, London, UK)

Cutasept (Bode Chemie, D-Hamburg)

4'6 – Diamidino–2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) (Mobitec, D-Göttingen)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) (Merck, D-Darmstadt)

Dispase I (Roche Diagnostics, D-Mannheim)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, D-München)

Entellan (Merck, D-Darmstadt)

Fetales Kälberserum (FKS) (PAA, Pasching, Österreich)

Fluorescein Avidin D (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Fluoromount (Serva, D-Heidelberg)

Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester (Fura -2- AM) (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)

Gelatine (Serva, D-Heidelberg)

Gey's Balanced Salt Solution (GBSS) (Tocris Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln)

D-Glukose (Sigma Aldrich, D-München)

L-Glutamat (Monosodium-Salz) (Sigma Aldrich, D-München)

L-Glutamin (Biochrom ,D-Berlin)

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biochrom ,D-Berlin)

Heparin (Ratiopharm, D-Ulm)

HEPES Lösung (PAA, Pasching, Österreich)

HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure) (Sigma Aldrich, D-München)

Histoclear (Ward's Natural Science, Rochester, NY, USA)

Kalibrierlösungen:

Flammenphotometer: Standard (Na/K 140/5 mmol/l)
 Null-Lösung (Cäsium-Diluent) (Instrumentation
 Laboratory, Lexington, KY, USA)

Osmometer: OPTI-MOLE™-Kalibrierungslösung
 (100/290/1000 mosm/kg), (MT Promedt Consulting, D-St.Ingbert)

pH-Meter: Qualilab Pufferlösung pH 6, 8 + 9, 27 (Kleinfeld Labortechnik,
 D-Hannover)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck, D-Darmstadt)

Ketaminhydrochlorid (Ketavet 10%, Pfizer GmbH, D-Karlsruhe)

Kohlenstoffdioxid (Messer Griesheim GmbH, D-Neuried)

Kresylviolett (Sigma Aldrich, D-München)

Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Merck, D-Darmstadt)

Meloxicam (Metacam®, Boehringer, D-Ingelheim)

Natriumchlorid (NaCl) (Merck, D-Darmstadt)

Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) (Merck, D-Darmstadt)

Neurobasal-A (Gibco, D-Karlsruhe)

Noradrenalin (Sigma Aldrich, D-München)
Normal horse serum (NHS) (PAA, Pasching, Österreich)
Paraffin (Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA)
Paraformaldehyd (PFA) (Merck, D-Darmstadt)
Phosphate buffered saline tablets (PBS)(Sigma Aldrich, D-München)
Penicillin/Streptomycin (Biochrom, D-Berlin)
Pentobarbital (Narcoren[®], Merial, D-Halbergmoos)
Phenylephrin (Sigma Aldrich, D-München)
Polyethylenglycol 4000 (PEG) (Sigma Aldrich, D-München)
Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich, D-München)
Prazosin (Sigma Aldrich, D-München)
Saccharose (Merck, D-Darmstadt)
Sauerstoff (Messer Griesheim GmbH, D-Neuried)
Steriles Wasser für die Zellkultur (PAA, Pasching, Österreich)
Tissue Tek[®] (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)
Triton X-100 (Sigma Aldrich, D-München)
True Blue (Mobitec, D-Göttingen)
Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2%, Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen)

2.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten der institutseigenen Zucht verwendet. Im Rahmen der telemetrischen Untersuchungen und der retrograden Tracing-Studie wurden männliche Tiere mit einem Körpergewicht (KG) von 270 - 350 g eingesetzt. Für die Imaging-Versuche in der primären Zellkultur wurden 4 - 6 Tage alte Wistar-Ratten beider Geschlechts verwendet. Die Aufzucht erfolgte in transparenten Polycarbonat-Käfigen (Typ IV) bei einer Raumtemperatur (RT) von $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem Beleuchtungsregime von 12 : 12 Stunden (= Std) (7:00/19:00 Uhr) Licht : Dunkel. Als Einstreu wurde Altromin „animal-bedding“ verwendet. Wasser und Futter (Rattenzuchtfutter Altromin) standen *ad libitum* zur Verfügung. Nach Erreichen des Absetzgewichtes von 110 ± 10 g erfolgte eine Geschlechtertrennung und gruppierte Umsetzung von bis zu fünf Tieren in großen Polycarbonat-Käfigen (Typ III). Unter diesen Haltungsbedingungen verblieben die Tiere bis zum Versuchsbeginn. Vor dem Beginn der Studie wurden beim RP Hessen die durchzuführenden Tierversuche per Antrag genehmigt (Projektnummer V54-19c20/15(1)GI 18/2 Nr. 10/2005).

2.3. Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer

2.3.1. Lösungen für die Immunhistochemie

2.3.1.1. Phosphatpuffer (PB)

Die Basislösung aller Inkubations- und Waschschriffe des immunhistochemischen Protokolls stellte ein jeweils frisch angesetzter 0,1 M/L Phosphatpuffer (PB) dar. Dieser Puffer wurde aus 0,2 M/L Stammlösungen von Dinatriumhydrogen-Phosphat (Na_2HPO_4) und Natriumdihydrogen-Phosphat (NaH_2PO_4) in Reinstwasser hergestellt. Durch Mischen von 720 ml NaH_2PO_4 und 280 ml Na_2HPO_4 erhielt man einen 0,2 M/L PB mit einem pH-Wert von 7,4, welcher durch Zugabe des gleichen Volumens an Reinstwasser (1 L) auf 0,1 M/L verdünnt wurde. Die Kontrolle des pH-Wertes von 7,4 erfolgte durch pH-Meter Messungen.

2.3.1.2. Präinkubationspuffer für Immunhistochemie

Um bei immunhistochemischen Untersuchungen mit Antigen-spezifischen Antikörpern/-seren eine erhöhte Hintergrundfärbung zu vermeiden, mussten potentiell unspezifische Antikörperbindungsstellen (elektrische Ladungen, Bindegewebsstrukturen etc.) des Gewebepreparates abgesättigt werden. Hierzu wurden dem PB 10 % normal horse serum (NHS) zugesetzt. Zur partiellen Permeabilisierung des Gewebes (Gefriermikrotomschnitte) wurde als Detergens 0,3 % Triton-X-100 hinzugefügt (Greis, 2007).

2.3.1.3. Inkubationspuffer für immunhistochemische Untersuchungen

Zur Inkubation der Gewebeschnitte mit den primären bzw. sekundären Antikörpern/-seren wurde dem PB 2 % normal horse serum und 0,1 % Triton-X-100 zugefügt. In dieser Lösung wurden die Antikörper/-seren aus bei -40°C tiefgefrorenen Aliquots durch Verdünnungsreihen auf ihre letztendlich eingesetzte Konzentration gebracht.

2.3.1.4. Avidin-Biotin Blocking Kit

Zur Absättigung potentieller Avidin– bzw. Biotin- spezifischer Bindungsstellen im Gewebeschnitt wurden jeweils 50 µl des Blocking Kits in 1 ml 0,1 M/L PB gelöst.

2.3.1.5. Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)

Die in der Immunhistochemie und -zytochemie eingesetzten spezifischen Antikörper/-seren sind gegen unterschiedliche Antigene gerichtet. Die spezifische Bindung des Antikörpers wird maßgeblich von der Konformation des Antigens beeinflusst. Um diese und die Lokalisation des Antigens zu erhalten, muss das zu untersuchende Gewebe fixiert werden. Hierzu wurde eine jeweils frisch angesetzte 4 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA) benutzt, deren fixierende Wirkung v.a. auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen beruht (Greis, 2007). Eine entsprechende Menge des pulverförmigen Paraformaldehyds wurde unter dem Abzug abgewogen und unter Rühren bei 60°C in PB gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines Faltenfilters (Ø 240 mm) filtriert und auf 4°C gekühlt. Die PFA-Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

2.3.1.6. Physiologische Kochsalzlösung

Zur schnellen Entblutung während der transkardialen Perfusion der Versuchstiere wurde eine 0,9 % Natriumchloridlösung benutzt (9 g NaCl / 1 L Reinstwasser).

2.3.1.7. Saccharoselösung (20 %)

Nach einstündiger Postfixation des Präparates in 4 % PFA musste die Fixationslösung mittels 10-min Waschung in PB aus dem Gewebe entfernt werden. Anschließend diente eine 12-stündige Überführung in 20 % Saccharoselösung in PB zur Kryoprotektion des Gewebes.

2.3.1.8. Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen

Grundlage des Inkubationspuffers für den Antigennachweis in der primären, neuroglialen Zellkultur waren phosphate buffered saline tablets, die in einer entsprechenden Menge Reinstwasser gelöst wurden (PBS: pH 7,4 130 mM/L NaCl, 8 mM/L Na_2HPO_4 , 1,2 mM/L NaH_2PO_4). Dieser Lösung wurden 10 % fötales Kälberserum und 0,05 % Triton-X-100 zugesetzt.

2.3.1.9. Waschpuffer für immunzytochemische Untersuchungen

Basislösung war PBS mit 0,05 % Triton-X-100.

2.3.2. Lösungen zur Zellkulturpräparation

2.3.2.1. Neurobasal-Medium A

100 ml des Neurobasal-Mediums wurden aus der Originalverpackung (500 ml) steril entnommen und 2 % B 27, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM/L Glutamin hinzugefügt. Diese Lösung wurde als Zellkulturmedium verwendet.

2.3.2.2. Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)

100 ml der GBSS wurden aus der Originalverpackung steril entnommen und darin 5 % D-Glukose gelöst. Die Lösung wurde in zwei Reaktionsgefäßen (Vol. 50 ml) angesetzt, deren Verschluss mit einer sterilen Kanüle zweimal perforiert wurde. Auf Eis gelagert und mittels einer Kanüle, die über ein Schlauchsystem und Sterilfilter mit einer Sauerstoffdruckluftflasche verbunden war, wurde die Lösung für ca. 20 min oxygeniert. GBSS diente als Lösung für die Herstellung primärer neuroglialer Zellkulturen des MnPO in Präparationsschalen und Vibratom.

2.3.2.3. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

20 ml der HBSS wurden steril aus der Originalverpackung (500 ml) entnommen und 20 mM/L HEPES hinzugefügt. Die Lösung wird in einem Reaktionsgefäß (Vol. 50 ml) angesetzt, dessen Verschluss mit einer sterilen Kanüle zweimal

perforiert wurde. Auf Eis gelagert und mittels einer Kanüle, die über ein Schlauchsystem und Sterilfilter mit einer Sauerstoffdruckluftflasche verbunden war, wurde die Lösung für ca. 20 min oxygeniert. Diese Lösung wurde zum Ansetzen der Dispase-Lösung und deren Inaktivierungslösung, zum Aufbewahren der dissoziierten Gewebestücke und zum Reinigen der Instrumente benutzt.

2.3.2.4. Ansetzen der Dispaselösung

Ein bei -20°C gelagertes Aliquot der Dispase (Vol. 1 ml) wurde im Heizblock (37°C) aufgetaut und 2 ml HBSS zugefügt. Die Gebrauchslösung enthielt eine Enzymaktivität von 2 U/ml.

2.3.2.5. Inaktivierungslösung der Dispase

Zur Inaktivierung der calciumabhängigen Dispase wurden 10 ml HBSS 1 mM/L EDTA zugefügt.

2.3.3. Lösungen für Ratio - Imaging Messungen

2.3.3.1. Calciummesspuffer

Der Calciummesspuffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 5 mM/L HEPES Natriumsalz, 130 mM/L NaCl, 10 mM/L D-Glukose, 5 mM/L KCl, 1 mM/L MgCl₂ und 1,25 mM/L CaCl₂. Er wurde für alle Ratio-Imaging Messungen zur Erfassung der intrazellulären Calciumkonzentration in Zellen des MnPO benutzt.

2.4. Methoden

2.4.1. Telemetrie

2.4.1.1. Der Sender

Um die Körperkerntemperatur [°C] und die lokomotorische Aktivität [ac] adulter männlicher Wistar-Ratten kontinuierlich erfassen zu können, wurden den Tieren VM-FH TR-3000 Sender in die Bauchhöhle implantiert. Bestehend aus zwei

ineinander gesteckten Polyethylenzylindern maßen sie 1,6 x 1,1 cm. Die Energieversorgung wurde durch eine Knopfzelle gewährleistet. Um die Elektronik des Senders nach Implantation vor peritonealer Flüssigkeit zu schützen, wurde Paraffin bei 70°C in einem Wärmeschrank geschmolzen und die Sender in das erkaltende Paraffin eingebettet.

2.4.1.2. Vorbereitung des Senders

Nach Einbetten in Paraffin wurde die Sendefrequenz eines jeden Senders für $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und $41,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bestimmt. Hierzu wurde ein Wasserbad auf die jeweilige Temperatur erwärmt und der Sender hineingelegt. Durch eine oberhalb des Senders befindliche Empfängerplatte wurde die für die jeweils vorherrschende Wasserbadtemperatur ($37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und $41,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) maßgebliche Sendefrequenz an einen PC übermittelt und durch das Programm „Dataquest IV“ erfasst und dokumentiert.

2.4.1.3. Implantation des Senders

Zur Implantation des Senders wurden die Tiere narkotisiert. Als Narkosemittel wurde eine Mischung aus 0,53 ml Ketamin (10 %) und 0,3 ml Xylazin (2 %) verwendet. Davon wurden 0,1 ml/100 g Körpergewicht (KG) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zur Vermeidung postoperativen Schmerzes erhielten die Tiere vor dem Eingriff 5 µl/100 g KG Meloxicam (7,5 mg/ml) subcutan (s.c.) steril injiziert. Zur Vorbereitung des OP-Feldes wurde die Bauchdecke geschoren und mit 70 % Alkohol desinfiziert. Nach peritonealer Eröffnung durch Stichinzision in der *Linea alba* wurde der Sender in das Abdomen implantiert. Mittels eines resorbierbaren Fadens (Surgicryl, 3 metric) erfolgte die Adaptation des *Peritoneum* und der Muskulatur durch Diagonalhefte, die der Haut mit Einzelheften.

2.4.1.4. Umsetzen der Versuchstiere in den telemetrischen Versuchsräum

Sämtliche telemetrischen Untersuchungen fanden in einer Klimakammer des Typs 10`US/+5 to+40 DU (2,15 x 2,15 x 2,65 m; L x B x H) mit je sechs Messplätzen statt. Nach Implantation der Sender wurden die Tiere einzeln in ihre

Versuchskäfige verbracht. Diese Käfige bestanden aus transparentem Plexiglas, maßen 30 x 22,5 x 24 cm (L x H x B) und wurden ca. 5 cm hoch mit Einstreu versehen. Der Deckel war mit mehreren Luftlöchern versehen. Eine Seitenwand bot durch Aussparungen Zugang zu Futter (gemahlen) und Wasser, das mittels einer Nippeltränke angeboten wurde. Die mit der Nippeltränke durch einen Schlauch verbundene Wasserflasche stand in einer Halterung auf einer Differenz-Waage. So war es möglich, den Wasserverbrauch kontinuierlich zu erfassen (Abb. 6). Zur Messung der Körperkerntemperatur (KT) und der lokomotorischen Aktivität während des Versuchs wurden die Käfige auf Empfängerplatten gestellt (Abb. 6). Diese übermittelten die Sendefrequenzen über den Dataport an ein Computer-Programm („Vital View“), welches basierend auf den Referenzfrequenzen für $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und $41,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ den KT-Verlauf dokumentierte. Mittels des im Sender enthaltenen Trägheitselements

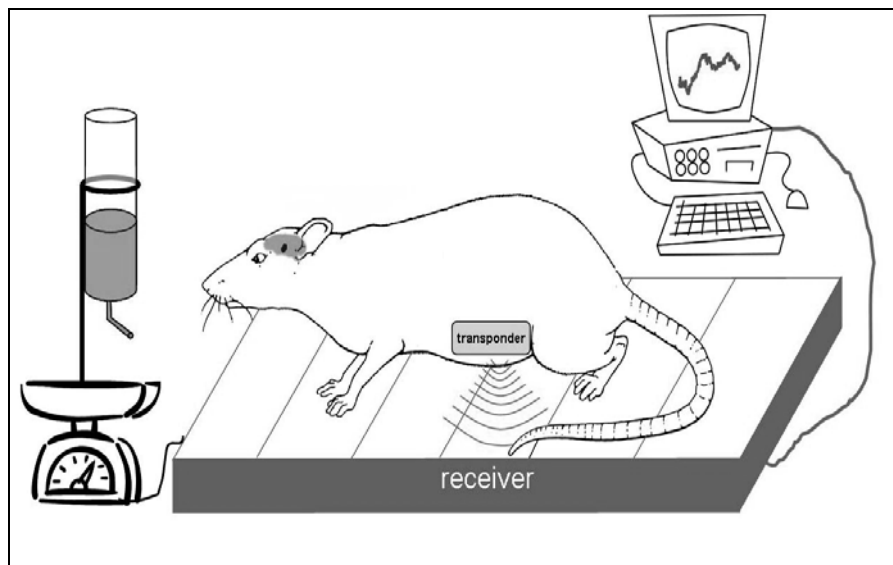


Abb. 6: Schematische Darstellung der einzelnen Komponenten des telemetrischen Systems

Zur Messung der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität während des Versuchs wurden die Käfige auf Empfängerplatten (receiver) gestellt. Diese übermittelten die Sendefrequenzen an ein Computerprogramm („Vital View“), welches den Temperaturverlauf dokumentierte. Mittels des im Sender enthaltenen Trägheitselementes konnten Informationen über die Bewegungsaktivität des Tieres übermittelt werden. Diese wurden durch „Vital View“ als activity counts [ac] aufgezeichnet. Die Datenaufzeichnung erfolgte in 5-min Intervallen. Die Wasseraufnahme wurde ebenfalls alle 5 min durch das Computerprogramm „Accuediet“ registriert.

konnten zusätzlich Informationen über die Bewegungsaktivität des Tieres übermittelt werden. Diese wurden durch „Vital View“ als benennungslose „activity counts“ [ac] aufgezeichnet. Die Datenaufzeichnung erfolgte in 5-min Intervallen als punktuelle Messung. Die Wasseraufnahme wurde durch kumulative Differentialwägung ebenfalls alle 5 min über den Dataport durch das Computer-Programm „Accudiet“ registriert, die Gewichtszunahme der Tiere durch tägliches Wiegen kontrolliert.

2.4.1.5. Auswertung der telemetrischen Daten

Alle erhobenen physiologischen Daten wurden von „Vital View“ (Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität) bzw. „Accudiet“ (Wasseraufnahme) in Excel Tabellen überführt. Zur übersichtlichen graphischen Darstellung des zeitlichen Verlaufs der KT wurden für jedes der insgesamt fünf Tiere jeder Versuchsgruppe mittels Kalkulations-Tabellen arithmetische Stundenmittelwerte (1-Std-MW) aus zwölf 5-min Perioden errechnet. Für jede Tierversuchsgruppe erfolgte dann die fortlaufende Berechnung der Mittelwerte der 1-Std-MW der Einzeltiere mit entsprechenden SEM Werten (Sachs, 2004), und mittels „Graph-Pad Prism (GPP)“ wurde der zeitliche Kurvenverlauf der KT einer Versuchsgruppe präsentiert. Die Darstellung des zeitlichen Verlaufs für die lokomotorische Aktivität sowie die Trinkwasseraufnahme erfolgte in Form von Balkendiagrammen („GPP“) nach kumulativer Errechnung von fortlaufenden 1-Std Werten aus jeweils zwölf 5-min Perioden für beide Parameter und jedes Versuchstier. Für eine Tierversuchsgruppe erfolgte dann wiederum die Berechnung der Mittelwerte der 1-Std-MW der Einzeltiere mit entsprechenden SEM Werten (Sachs, 2004).

Aufgrund der ausgeprägten circadianen Rhythmik mit markanten Unterschieden zwischen Tag- und Nachtphasen für alle drei Messparameter (Körperkerntemperatur, Lokomotion und Trinkwasseraufnahme) wurde eine Unterteilung der Licht- und Dunkelperioden in jeweils zwei Phasen zu je sechs Stunden Dauer vorgenommen. Auf Basis der 1-Std-MW wurden arithmetische (KT) oder kumulative (Lokomotion, Trinkwasseraufnahme) 6-Stundenmittelwerte (6-Std-MW) für jedes Tier, und nachfolgend 6-Std-MW mit SEM für jede Tierversuchs-

gruppe berechnet und jeweils als Balkendiagramm abgebildet („Prism 3.0“). Die statistische Auswertung der Daten für Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität und Tränkeaufnahme erfolgte für den Vergleich zwischen den verschiedenen Tages- und Nachtphasen sowie Versuchs-Protokollen (siehe Kap. 2.4.2) anhand der 6-Std-MW mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests (Sachs, 2004).

2.4.2. Versuchsansätze

Um den als Ziel der vorliegenden Arbeit formulierten Aufgabenstellungen gerecht zu werden, wurden vier Gruppen zu je fünf Versuchstieren gebildet, welche unterschiedlichen Versuchsbedingungen im Rahmen einer „challenge“ der Homöostase von Körpertemperatur und/oder Salz- und Wasserhaushalt ausgesetzt wurden.

Gruppe A wurde durch Erhöhung der Raumtemperatur auf 30°C für 48 Std bei gleich bleibender Luftfeuchte von 50 % einem milden Temperaturstimulus ausgesetzt. Der Zugang zu Trinkwasser war dieser Gruppe zu jeder Zeit möglich, um den Wasserverlust durch die thermisch induzierte Zunahme transkutaner und evaporativer Wärmeabgabe ausgleichen zu können (Gerstberger, 1999). Es handelte sich um eine relativ „reine“ thermische Belastung.

Gruppe B wurde durch Erhöhung der Raumtemperatur auf 33°C für 48 Std einer erhöhten thermischen Belastung (Hitzestress) unterzogen. Dadurch sollte sowohl eine Hyperthermie als auch ein Anstieg der Plasmaosmolalität erreicht werden. Bei permanentem Zugang zu Trinkwasser lag die gewählte Raumtemperatur deutlich oberhalb der Thermoneutralzone der Ratte (23,5 - 30,5°C), so dass eine vollständige Kompensation des Hitze-induzierten Wasserverlustes nicht mehr möglich war (Gordon, 1987; Romanovsky *et al.*, 2002). Es handelte also sich um eine kombinierte Störgröße des thermo- wie auch osmoregulatorischen Regelkreises.

Bei **Gruppe C** wurde mittels intraperitonealer Injektion von körperwarmem Polyethylenglycol 4000 (PEG; 30 %; 2,2 ml/100 g KG) und dadurch bedingter trans-

kapillärer Wasser- und Elektrolytverschiebung eine isotone, intravasale Hypovolämie ohne Änderung der Plasmatonizität induziert (Stricker *et al.*, 1979; Stricker & Verbalis, 1986; Rowland *et al.*, 1996). Es handelte sich um einen volumenregulatorischen Stimulus.

Gruppe D wurde durch den Entzug von Trinkwasser für 24 Std bei einer Umgebungstemperatur im Bereich der Thermoneutralzone ($23 \pm 0,5^\circ\text{C}$) einer milden Stimulation des osmoregulatorischen Regelkreises zur Konstanzhaltung der Tonizität der extrazellulären Körperflüssigkeit (EZK) unterzogen (Horowitz & Meiri, 1985; Patronas *et al.*, 1998). Es handelte sich also um einen relativ „reinen“ osmotischen Stimulus mit marginaler extrazellulärer Hypovolämie.

Vor Beginn der experimentell-physiologischen Untersuchungsreihen wurde den chronisch instrumentierten Tieren eine Rekonvaleszenzzeit von einer Woche gewährt, da innerhalb dieses postoperativen Zeitraums die physiologische circadiane Rhythmik und endokrine Regelkreise vollkommen wieder hergestellt sind. So konnte sichergestellt werden, dass Veränderungen in den erhobenen Parametern (Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität, Wasseraufnahme, Plasmaosmolalität, Hämatokrit, Plasma-Natriumkonzentration, Zahl der nNOS- und Fos-positiven Neurone in Kerngebieten des Hypothalamus) nicht Nebenwirkungen des chirurgischen Eingriffs zuzuschreiben waren, sondern spezifische Antworten der Versuchstiere auf die physiologischen Stimulationen darstellten. Drei Tage vor Stimulationsbeginn begann die telemetrische Aufzeichnung der Ganztier-physiologischen Parameter, um Kontroll-Referenzwerte zu erhalten, die mit denen während physiologischer Stimulation verglichen werden konnten. Die Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer betrug 50 % bei einem 12 : 12 Std Tag : Nacht Rhythmus.

Unmittelbar nach Abschluss der unterschiedlichen experimentellen Versuchsansätze wurden die Tiere gewogen, wie in Kap. 2.4.5.3 beschrieben narkotisiert, eine Blutprobe entnommen (Kap. 2.4.3) und die Tiere anschließend für die neurowissenschaftliche, immunhistologische Analyse transkardial perfundiert (Kap. 2.4.5.3).

2.4.3. Bestimmung der Blutparameter

Um den Einfluss der thermischen, osmo- und volumenregulatorischen Stimuli auf den Status der EZF zu beurteilen, wurde jedem Tier nach Beendigung der Versuchsdurchführung (Gruppen A - D) und unmittelbar vor der transkardialen Perfusion unter Narkose (siehe Kap. 2.4.5.3) durch Herzpunktion eine Blutprobe (heparinisiert: 10 µl Heparin \approx 25 IE/ml pro ml Blut) entnommen. Zur Ermittlung des Hämatokritwertes wurden jeweils drei Hämatokrit-Kapillaren mit Vollblut befüllt. Der Rest der Vollblutprobe wurde zwecks Plasmagewinnung in eine Tischzentrifuge verbracht, für 5 min bei 7000 Umdrehungen/min (UPM) zentrifugiert und der Plasmaüberstand in ein Eppendorfgefäß mittels Pipette überführt. Folgende Parameter wurden unmittelbar bestimmt :

2.4.3.1. Hämatokritwert

Die befüllten Hämatokritkapillaren wurden in die dafür vorgesehenen Spalten des Zentrifugentellers einer Hämatokritzentrifuge eingelegt und dieser durch einen Schraubdeckel dicht verschlossen. Das heparinisierte Blut wurde für 5 min bei 12000 UPM und RT zentrifugiert und der Hämatokritwert [L/L] mit Hilfe einer Schiebeschablone abgelesen.

2.4.3.2. Plasma-Na⁺-Konzentration

Der Natriumkonzentration [mmol/kg] des frisch gewonnenen Plasmas wurde mittels Flammenphotometrie bestimmt. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass die Valenzelektronen der Alkalimetalle Natrium, Kalium und Lithium durch thermische Energie in der Propangasflamme auf ein höheres Energieniveau angehoben werden, welches sie nach kurzer Verweilzeit unter Energieabgabe wieder verlassen. Die freiwerdende Energie wird als Licht mit elementspezifischer Wellenlänge abgestrahlt. Die Menge an abgestrahltem Licht ist proportional zur Anzahl der Atome, die als verdünnte Probelösung in die Flamme gesprüht wurde. Vor jeder Messreihe wurde das Flammenphotometer mittels Standard- und Null-Lösung kalibriert und die Natriumkonzentration der Plasmaproben (Vol. 20 µl) durch dreifache Messung bestimmt.

2.4.3.3. Plasmaosmolalität

Osmolalitätsmessungen [mosm/kg] des Blutplasmas erfolgten mit einem Dampfdruck-Mikroosmometer, welches den exakten Dampfdruck über einer flüssigen Phase durch Bestimmung des Taupunkts ermittelt. Hierzu werden 10 µl einer Flüssigkeitsprobe (z.B. Plasma des Blutes) auf ein Filterscheibchen pipettiert, das sich in der Mulde eines Probenhalters befindet, welcher in die Messkammer eingeschoben wird. Als Messfühler dient ein Thermo-Element indirekt als Hygrometer. In der ersten Phase der Messung stellt sich durch rasche, transiente Erwärmung mittels Thermo-Element in der Messkammer rasch ein Temperatur- und Dampfdruckgleichgewicht ein. Hierauf wird das Thermo-Element durch Peltiereffekt unter den Taupunkt gekühlt, so dass sich auf der Oberfläche ein mikroskopisch dünner Flüssigkeitsfilm bildet. Der Kühlstrom des Thermoelements wird bis zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts reduziert, so dass eine Temperaturänderung des Elements nur noch durch Kondensation oder Verdunstung des Wassers in der Messkammer bewirkt werden kann. Die Wärmefreisetzung des kondensierenden Wassers führt zu einem Temperaturanstieg bis zum Taupunkt der Flüssigkeit, an dem dieses weder verdunstet noch kondensiert. Aus der konstanten Temperatur im Bereich des Taupunkts wird über den Dampfdruck die Osmolalität der gemessenen Probe in [mosm/kg] errechnet. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte vor jeder Messreihe unter Verwendung dreier Standard-Lösungen mit Osmolalitäten von 100, 290 und 1000 mosm/kg. Die Osmolalität der jeweiligen Plasmaprobe wurde per dreifacher Messung bestimmt.

2.4.3.4. Auswertung der Blutparameter

Die Werte der erhobenen Blutparameter der verschiedenen Gruppen wurden graphisch als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des nicht parametrischen Mann-Whitney U Rangtests. Bei der Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $2p \leq 0,05$ gewählt.

2.4.4. Neuronales retrogrades Tracing

2.4.4.1. Stereotaktische Operationseinheit und –technik

Die Methode des retrograden neuronalen Tracing wurde eingesetzt, um eine efferente Verbindung MnPO-intrinsischer Neurone zum pPVN zu identifizieren. Zur exakten Mikroapplikation des Tracers true blue (TB) in den Bereich des pPVN adulter Ratten wurde eine Operationseinheit bestehend aus einem stereotaktischen Apparat (Abb. 7), einer Wärmematte mit Regulierungselement zur servokontrollierten Konstanthaltung der Körperkerntemperatur des zu operierenden Tieres und einer pneumatischen Druckeinheit mit Pulsgenerator zur stereotaktischen Applikation des retrograd zu transportierenden Farbstoffes ein-

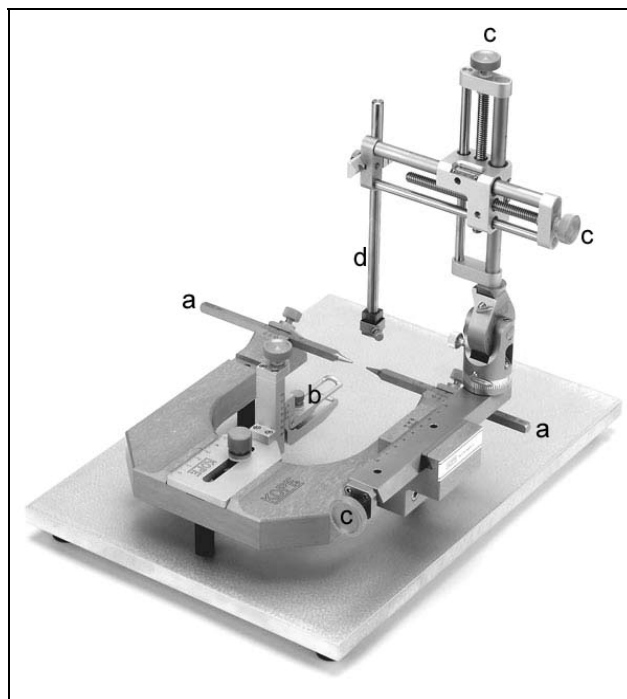


Abb. 7: Stereotaktische Apparatur nach Kopf zur intrahypothalamischen Mikroapplikation neuronaler Tracersubstanzen.

(a) metallische Stifte („ear bars“) zur Fixation des Schädels, (b) höhenverstellbare Stütze, (c) Mikromanipulatoren zum Einstellen der Anterior-, Lateral- und Tiefenkoordinate, (d) Stativ mit Kanülenhalterung zur Fixation der Mikrogaskapillare. Die Fixation des Kopfes erfolgte an drei Punkten: im Bereich der äußeren Gehörgänge mittels „ear bars“ (a) und am Oberkiefer durch Aufsetzen der Schneidezähne auf eine höhenverstellbare Stütze (b). Mittels der Mikromanipulatoren (c) konnte der Kopf des Tieres in der Horizontalen ausgerichtet werden.

gesetzt. Die visuelle Kontrolle des stereotaktischen Eingriffs erfolgte mit Hilfe eines Binokulars.

Nach der Rasur der Kopfbehaarung vom lateralen Augenwinkel bis zum Nackenansatz wurde das wie in Kapitel 2.4.1.3 beschriebene narkotisierte Tier auf die konstant temperierte Wärmematte (37°C) gelegt. Die Fixation des Kopfes erfolgte an drei Punkten: im Bereich der äußeren Gehörgänge mittels zweier schlank zulaufender metallischer Stifte („ear bars“) und am Oberkiefer durch Aufsetzen der Schneidezähne auf eine höhenverstellbare Stütze (Abb. 7). Anschließend wurden die Kopf- und Unterhaut über der Medianen mit einem Skalpell auf einer Länge von 2 cm eröffnet. Die Schädeldecke wurde durch stumpfe Präparation freigelegt, das Periost mittels Skalpell abgelöst und der Knochen durch Benetzung mit 30 % Wasserstoffperoxid desinfiziert und lokal gebleicht. Hierdurch traten die Kreuzungspunkte der bindegewebigen Knochennähte, die *Sutura lamboidea* (*Lambda*) und die Kreuzung der *Suturæ interfrontalis*, *sagittalis* und *coronalis* (*Bregma*) (Abb. 8) besser zum Vorschein und konnten mittels der Mikromanipulatoren (x,y,z-Achsen) auf gleichen Horizontalen ausgerichtet werden.

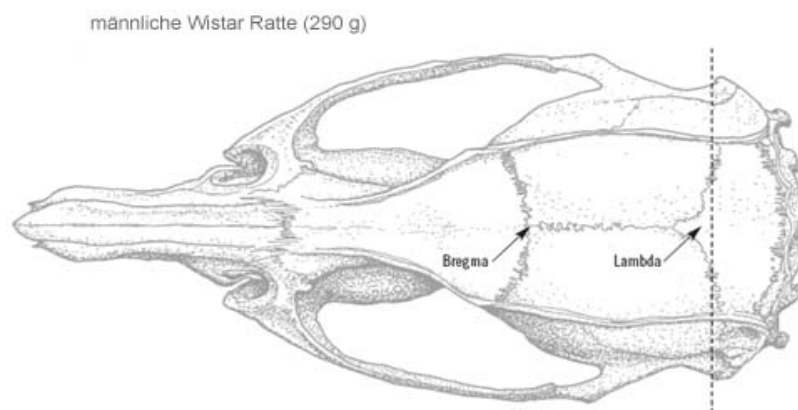


Abb. 8: Schematische Darstellung der Orientierungspunkte *Lambda* und *Bregma* im Schädel der Ratte nach Paxinos/Watson 2006

Kreuzungspunkte der bindegewebigen Knochennähte; die *Sutura lamboidea* (*Lambda*) und die Kreuzung der *Suturæ interfrontalis*, *sagittalis* und *coronalis* (*Bregma*)

Die Wahl der Koordinaten zur Trepanation der Schädelkalotte mit nachfolgender Insertion einer ausgezogenen Glaskapillare im Bereich des pPVN erfolgte in Anlehnung an frühere Untersuchungen zur Projektion MnPO-intrinsischer Neurone in den pPVN (McKinley *et al.*, 1992; Stocker & Toney, 2005) sowie nach Durchführung eigener Vorversuche unter Verwendung des stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (2006); die Koordinaten ergaben sich zu 1,5 mm anterior und 0,4 mm lateral zum *Bregma*. Nach Durchbohren des Schädelknochens wurde die *Dura mater* vorsichtig eröffnet, um die stereotaktische Einführung der Glaskapillare (GP1508P) zu ermöglichen. Die mit dem Tracer true blue gefüllte, ausgezogene Kapillare (Spitzendurchmesser 30 µm; eigene Herstellung mit „micropipette puller“) wurde daraufhin ausgehend von *Bregma* mittels der Mikromanipulatoren entsprechend der Lateral-, und Anteriorkoordinaten ausgerichtet und auf die Tiefenkoordinate von 7,4 mm abgesenkt. Mit einem definierten Druckimpuls von 80 mbar, der mit Hilfe des Pulsgenerators eingestellt werden konnte, wurden ca. 30 nl des fluoreszierenden Farbstoffes während 0,1 sec in den pPVN appliziert und die Glaskapillare für 10 min in dieser Position belassen (Abb. 9). Durch Auskristallisieren von TB in der Kapillarspitze konnte eine Kontamination des Stichkanals beim Entfernen der Injektionskanüle vermieden werden. Die Haut wurde danach mittels Einzelheften adaptiert. Anschließend wurde, wie in Kap. 2.4.1.3 beschrieben, ein Telemetrie-Sender intraperitoneal zur Erfassung der Körperkerntemperatur und lokomotorischen Aktivität implantiert und das Tier in den telemetrischen Versuchsraum umgesetzt. Nach einer Rekonvaleszenzzeit von einer Woche wurden die Tiere entweder in Stimulationsversuche eingebunden oder zum alleinigen neurohistologischen Nachweis retrograder Projektionsstudien wie in Kapitel 2.4.5.3 beschrieben transkardial perfundiert.

2.4.5. Immunhistochemie

2.4.5.1. Grundlagen der Immunhistochemie/Immunzytochemie

Die Grundlage der Immunhistochemie/Immunzytochemie ist der histologische Nachweis der Bildung eines (sub-)zellulär lokalisierbaren Antigen-Antikörper

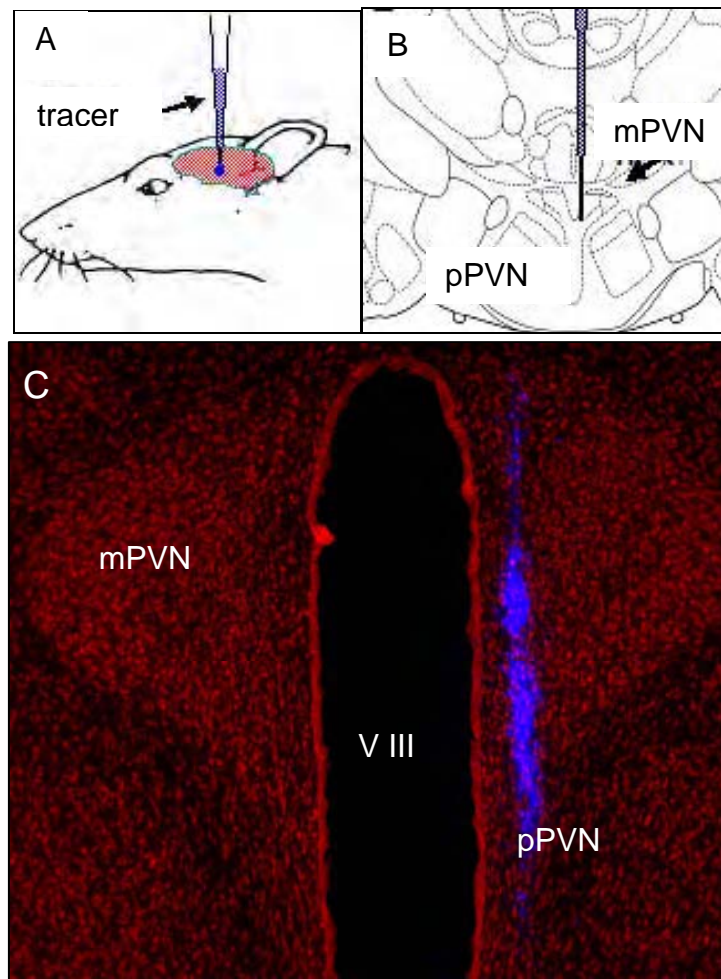


Abb. 9: Schematische Darstellung der Tracer-Injektion.

A: Schematische Darstellung der Injektionsstelle in der Sagittalanzeige des Rattenschädels

B: Schematische Darstellung der Mikrokapillare in einem Coronalchnitt des Rattenhirns (Figur 46, Bregma -1,56 mm, Paxinos & Watson 2006) zur Tracer-Applikation in den paraventriculären Anteil des *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus.

C: Darstellung der Mikroapplikationsstelle des retrograden Tracers true blue im coronalen Gehirnschnitt der Ratte (40 µm Dicke). (mPVN: magnozellularer Anteil des PVN, pPVN: paraventriculärer Anteil des PVN, V III: dritter Hirnventrikel)

Komplexes. Unter Verwendung spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper /-seren (meist IgG-Varianten) können antigene Strukturen in Zellen und Geweben histologisch lokalisiert werden (Harlow & Lane, 1988). Die Determinante des Antigens (Ag), an welche der Antikörper (Ak) bindet, wird als Epitop, die Antigen-bindende Domäne des Ak als Paratop bezeichnet (Drößler & Gerns, 2000; Liddell & Weeks, 1996). Bei den als Immunglobuline bezeichneten Anti-

körpern handelt es sich um von Plasmazellen gebildete Glykoproteine, die aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten bestehen. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden einerseits das konstante F_c Fragment (*fragment crystallizable*), andererseits zwei F_{ab} Fragmente (*fragment antigen binding*). An den Terminalen der F_{ab} Region befinden sich hypervariable Bereiche mit den Paratopen, an welche die Epitopbindung stattfindet (Drößler & Gemsa, 2000; Janeway & Travers, 1997). Der histologische Nachweis von Antigen-Antikörper Komplexen im Gewebe bzw. in der Zellkultur kann durch direkte und indirekte Markierungsverfahren erfolgen. Ist der antigenspezifische Antikörper (= primärer Antikörper) z.B. selbst mit einem visuell detektierbaren Liganden markiert, so handelt es sich um eine direkte Markierung. Wird zur Detektion des primären Antikörpers ein weiterer, seinerseits markierter Antikörper eingesetzt, dessen Paratope spezifisch an das F_c Fragment des primären Antikörpers binden (= sekundärer Antikörper), so wird dies als indirekte Markierung bezeichnet. Als „Markierungs“-Substanzen können außer Fluorochromen, wie in der vorliegenden Arbeit, auch Enzyme, Radioisotope oder Metallionen verwendet werden (Lidell & Weeks, 1996).

2.4.5.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Für diese Arbeit wurde als Markierung die indirekte Immunfluoreszenz gewählt (Coons, 1958) (Abb. 10). Bei höherer Sensitivität sowie geringerer Hintergrundfärbung, verglichen mit der direkten Markierung, ist darüber hinaus eine Mehrfachmarkierung möglich, so dass gleichzeitig mehrere Antigene sowie deren charakteristische Verteilungsmuster etwa in einem Gehirnschnitt detektiert werden können. Das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenzmarkierung bei Anregung im UV-Bereich stellen einen Nachteil dar; spezielle Einbettmedien (hier: Fluoromount) verzögern jedoch diesen Vorgang (Janeway & Travers, 1997).

Durch die in diesen Untersuchungen durchgeführte Zweifachmarkierung für das NO-generierende Enzym nNOS und den neuronalen Aktivitätsmarker Fos sollte der quantitative Nachweis der durch Hitze-, Thermo-, Osmo- bzw. Volumen-

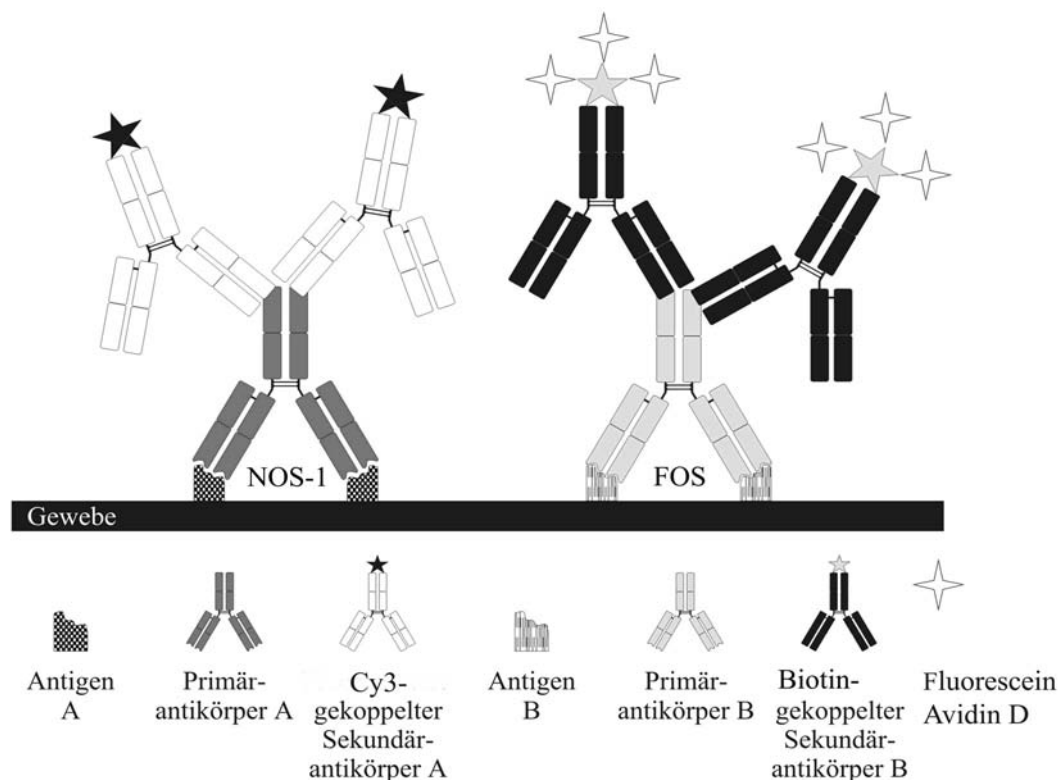


Abb. 10: Prinzip der differentiellen Doppelmarkierung zweier Antigene mittels indirekter Immunfluoreszenz im Gewebeschnitt

Die primären Antikörper A (*monoclonal mouse anti-nNOS*) + B (*polyclonal rabbit anti-Fos*) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene A (nNOS) + B (Fos). Mit Hilfe eines Fluorochrom (Cy3)-gekoppelten Sekundärantikörpers (B), welcher gegen das F(c)-Fragment des Primärantikörpers (A) gerichtet ist, kann dieser Ag-Ak Komplex sichtbar gemacht werden. Zur intensiveren Visualisierung des nukleären Antigens B (Fos) kommt ein biotinylierter Sekundärantikörper (B) zum Einsatz, der durch an Biotin bindendes Fluorescein-Avidin D detektiert werden kann.

stimulation induzierten Translokation des nukleären Fos-Proteins in nitrergen und nicht-nitrergen Neuronen des MnPO erfolgen (Patronas *et al.*, 1998). Bei Anwendung des indirekten Immunfluoreszenzverfahrens in dieser Arbeit detektierte im ersten Schritt ein jeweils spezifischer unmarkierter Primärantikörper das peptiderge Epitop der nNOS bzw. des Transkriptionsfaktors Fos. Die Fluorophormarkierung der zytoplasmatischen nNOS erfolgte in einem zweiten Schritt mit dem Cy3-(Carboxymethylindocyanin) gekoppelten und gegen die F(c)-Region des spezies-spezifischen Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörpers (Abb. 10). Um eine vergleichbare Intensität der Fos-Markierung zu erreichen, erfolgte eine Signalamplifikation mittels der Avidin-Biotin Methode.

Grundlage dieser Methode ist der Einsatz eines biotinylierten Sekundärantikörpers, der nach Bindung an den Primärantikörper des Ag-Ak Komplexes aufgrund des kovalent gebundenen Biotins und dessen hoher Affinität zu Streptavidin ($K_D = 10^{-15} \text{ M}^{-1}$) an den Avidin-Fluorescein-D Komplex bindet und somit das Signal um ein Vielfaches verstärkt (Abb. 10). Die Anregung der Fluorophore mit Licht geeigneter Wellenlänge führte nach entsprechender Filterung zu einer längerwelligen Emissionsstrahlung des angeregten Fluorophors. Das Avidin-D gebundene Fluorescein wurde durch Licht einer Wellenlänge von 450 - 490 nm angeregt und emittierte grünes Licht einer Wellenlänge von 510 - 530 nm. Cy3 wurde durch gefiltertes Licht der Wellenlänge 510 - 530 nm angeregt und emittierte hellrotes Licht einer Wellenlänge von 560 - 570 nm.

2.4.5.3. Perfusion

Zur Gewinnung des immunhistochemisch zu untersuchenden Gehirngewebes mussten die Tiere mit steriler, isotoner NaCl-Lösung (Kapitel 2.3.1.6) und jeweils frisch angesetztem, nicht polymerisierten PFA (4 %) (Kapitel 2.3.1.5) transkardial unter einem Abzug perfundiert werden. Das benutzte Perfusionssystem bestand aus einer Fußpumpe, welche die genannten Lösungen mit einem definierten Druck (ca. 100 mmHg), der dem arteriellen Mitteldruck einer Ratte entspricht, in das Blutgefäßsystem des Tieres einleitete. Unmittelbar nach der 48-stündigen Wärmeexposition (Gruppe A), dem 48-stündigen Hitzestress (Gruppe B), der 3-stündigen Wirkung des PEG (Gruppe C) oder dem 24-stündigen Wasserentzug (Gruppe D) wurden die Tiere mit 0,1 ml/100 g KG Pentobarbital (160 mg/ml) i.p. tief narkotisiert und nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes in Rückenlage auf einem Gitter mit unterliegender Ablaufwanne an allen vier Extremitäten durch Klebeband fixiert. Nach Eröffnung des Abdomens durch einen halbkreisförmigen Schnitt unterhalb des Rippenbogens wurde zuerst der Sender zur telemetrischen Aufzeichnung physiologischer Parameter entnommen. Das Zwerchfell wurde an seinem Ansatz von der Thoraxwand abgetrennt und die Rippen rasch mit einer Schere durchtrennt. Durch Anbringen einer Klemme am *Cartilago xyphoideus* konnte die ventrale Thoraxwand nach oben geklappt werden. Nach Inzision des Herzbeutels und anschließender Freipräparation des Herzens wurde durch Punktion mit einer

Kanüle eine heparinisierte Blutprobe (1 ml) aus dem schlagenden, linken Ventrikel zur Bestimmung der Blutparameter (siehe Kapitel 2.4.3) entnommen. Danach wurde der linke Ventrikel durch eine 0,5 cm lange Stichinzision eröffnet und eine Knopfkanüle, die über einen Schlauch mit der Perfusionsapparatur verbunden war, bis in den Aortenbogen vorgeschoben. Sofort nach Start der transkardialen Perfusion bei einem Druck von 100 mmHg mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung bei RT wurde mittels Stichinzision der rechte Vorhof eröffnet. Nach vollständiger Entblutung erfolgte das Einleiten der 4°C kalten PFA-Lösung durch Bedienen eines Dreivegehahns. Zur vollständigen transkardialen Perfusion des Tieres wurden ca. 300 ml benötigt.

2.4.5.4. Präparation des Gehirns und Anfertigung der Gefrierschnitte

Nach Durchtrennen der Kopfhaut durch einen Scherenschnitt wurde die Schädeldecke von Muskulatur und Bindegewebe befreit. Mit Hilfe einer Pinzette wurde der Schädel in den medialen Augenwinkeln fixiert und mittels einer Knochenzange eröffnet. Nach sorgfältigem Abpräparieren der Hirnhäute wurde das Gehirn entnommen und *Cerebellum* und *Medulla oblongata* auf der Coronal-ebene der *Pons* vom *Cerebrum* mittels Skalpell getrennt. Nach Postfixation mit 4°C kaltem PFA für 60 min wurden beide Anteile in ein 50 ml Schraubgefäß mit 20 % Saccharoselösung (Kapitel 2.3.1.7) überführt und für 12 Std bei 4°C aufbewahrt. Nach vollständigem Austausch des PFA durch die Saccharoselösung wurde das *Cerebrum* mit seiner caudalen, das *Cerebellum* / *Medulla oblongata* Präparat mit seiner rostralen Schnittfläche auf dem Objekthalter des Gefriermikrotoms mit Gefrier-Einbettmedium nach Justierung aufgeblockt. Durch rasches Entspannen von unter Druck stehendem CO₂-Gas (60 bar) aus einer Druckflasche durch den metallenen Objekthalter des Gefriermikrotoms konnte ein rasches, homogenes Durchfrieren der Gewebepreparate ohne histologisch nachweisbare Gefrierschäden erzielt werden, wobei eine Abdeckung über Präparat und Objekthalter gehalten wurde, so dass das ausströmende Gas innerhalb des Deckels einheitlich verwirbelt wurde.

Die coronalen Gehirnschnitte (40 µm) wurden mit einem Pinsel (Rotmarderhaar) vom Messer des Mikrotoms aufgenommen und in einen mit 0,1 M/L PB

gefüllten Glasbehälter (Durchmesser 16 cm) überführt. In diesem befand sich ein in acht Sektoren gegliederter Einsatz aus transparentem Polycarbonat, dessen Boden ein feinmaschiges Polyethylenetz bildete. Die hier aufbewahrten Schnitte wurden vollständig vom Puffer umspült („free-floating“ Verfahren) (Greis, 2007).

2.4.5.5. Gelatine-Beschichtung der Objektträger

Zur Vorbereitung der zu beschichtenden Objektträger (OT) wurden diese für zwei Stunden in 70°C warmer Seifenlauge aufbewahrt und anschließend unter fließendem Leitungswasser klargespült. Zur Entfettung erfolgte eine sequentielle Waschung mit 70 % Äthanol und entionisiertem Reinstwasser. Nach Erstellen einer Lösung aus 0,5 % Gelatine und 0,05 % Chromalaun (Bakterienschutz) in Reinstwasser sowie deren Filtration mittels Faltenfilter und Erhitzung auf 60°C wurden die OT für 10 sec in die Gelatine-Lösung eingetaucht. Zur Trocknung der beschichteten OT erfolgte eine Lagerung im bei 60°C temperierten Trockenschrank.

2.4.5.6. Protokoll des indirekten Immunfluoreszenznachweises für die zelluläre Expression von nNOS/Fos sowie des α_1 -Adrenozeptors

Zur Absättigung möglicher unspezifischer Bindungsstellen für die Antigen-spezifischen Immunglobuline wurde ein Glasbehälter mit Sektoreneinsatz (Kap. 2.4.5.4) mit 100 ml Präinkubationspuffer gefüllt und die Gehirnschnitte für zwei Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 Gehirnschnitte in sterilen Reaktionsgefäßen mit dem polyklonalen, Fos-spezifischen Antiserum aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:1000 in Inkubationspuffer) sowie dem monoklonalen, nNOS-spezifischen Antikörper aus der Maus (Verdünnung 1:500 in Inkubationspuffer) in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 48 Std bei 4°C lichtgeschützt inkubiert (Tab 1). Die Detektion des α_1 -Adrenozeptors erfolgte gemäß des Protokolls für den Nachweis der nNOS (Tab. 1) durch Inkubation mit einem polyklonalen Antiserum aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:500 in Inkubationspuffer). Zur Entfernung ungebundener primärer Immunglobuline erfolgte ein 3 x 5 min Waschschrift, für den die mit den primä-

ren Antikörpern/-seren inkubierten Gehirnschnitte wiederum in die sektoriell gegliederten, mit jeweils frischen PB (100 ml) gefüllten Glasgefäße mit Hilfe eines Pinsels überführt wurden. Die Gehirnschnitte wurde daraufhin in mit 500 µl Avidin-Blocking-Kit gefüllte Reaktionsgefäße überführt und nach 15 min Inkubation 3 x 5 min Waschschritten in frischem PB unterzogen. Anschließend erfolgte die Absättigung potentieller Biotin-Bindungsstellen mit 500 µl Biotin-Blocking-Kit in 5 ml Reaktionsgefäßen mit anschließenden 3 x 5 min Waschschritten in jeweils frischem PB.

Zur Detektion der Antigen-gebundenen primären Antikörper im Gehirnschnitt enthielt der zweite Inkubationspuffer einen sekundären, biotinylierten goat-anti-rabbit IgG Antikörper (Verdünnung 1:200) und einen Cy3-markierten donkey-anti-mouse IgG Antikörper (Verdünnung 1:800); die Inkubation wurde für eine Stunde bei RT unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschriff wurden jeweils 10 Gehirnschnitte in 500 µl Fluorescein-Avidin-D (Verdünnung 1:300) haltigen Inkubationspuffer überführt und wiederum für eine Stunde bei RT und lichtgeschützt inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschriff in den sektoriell gegliederten Glasgefäßen wurden die Gehirnschnitte mit Hilfe eines Pinsels auf mit Gelatine beschichtete OT aufgetragen und für 12 Std bei RT und lichtgeschützt getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wurden die auf OT aufgezogenen coronalen Gehirnschnitte mit Fluoromount gedeckelt.

2.4.5.7. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen im OVLT und MnPO erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Zur Lokalisation immunreaktiver Zellen (nNOS), Zellkerne (Fos) oder retrograd markierter Neurone (true blue) des MnPO wurde dieser in seine drei Substrukturen, aMnPO, vMnPO und dMnPO unterteilt (Abb. 11). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer hochauflösenden Restlichtkamera gemacht und bildanalytisch mit dem Programm „Metamorph“ bearbeitet. Gehörten die Tiere zur stereotaktisch operierten Versuchsgruppe, wurde zusätzlich eine Aufnahme der true blue

| Arbeitsschritt | Reagenz | Zeit/Temperatur |
|--|--|-----------------|
| Waschen | 0,1 M/L PB | 3 x 5 min |
| Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen | 10 % NHS + 0,3 % Triton-x-100 in PB | 2 Std bei RT |
| Inkubation mit primären Antikörper | polyclonal rabbit anti-Fos (1:1000) monoclonal mouse anti-nNOS (a:500) in 2 % NHS + 0,1 % Triton-x-100 in PB | 48 Std bei 4°C |
| Waschen | 0,1 M/L PB | 3 x 5 min |
| Absättigen unspez. Biotin- Bindungsstellen | Biotin-Blocking Kit (50 µl/ml 0,1 M/l PB) | 15 min bei RT |
| Waschen | 0,1 M/L PB | 3 x 5 min |
| Absättigen unspezif. Avidin-Bindungsstellen | Avidin-Blocking Kit (50 µl/ml 0,1 M/l PB) | 15 min bei RT |
| Waschen | 0,1 M/L PB | 3 x 5 min |
| Inkubation mit sekundärem Antikörper | biotinylierter goat-anti-rabbit IgG(1:200) Cy3-donkey-anti-mouse (1:800) in 2 % NHS + 0,1 % Triton-x-100 in PB | 2 Std bei RT |
| Waschen | 0,1 M/L PB | 3 x 5 min |
| Detektieren des Biotins | Fluorescein Avidin D (1:300) in 2 % NHS + 0,1 % Triton-x-100 in PB | 1 Std bei RT |
| Waschen | 0,1 M/L PB | 3 x 5 min |
| Aufziehen | gelatinebeschichtete Objektträger | |
| Trocknung | | 12 Std |
| Deckeln | 4 Tropfen Fluoromount, Deckgläser | |

Tab. 1: Protokoll der indirekten Immunfluoreszenz (nNOS/Fos)

(TB) enthaltenden Neurone bei einer Anregungswellenlänge von 375 nm und einer Emissionswellenlänge von 403 nm angefertigt. Da sich die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorophore nur marginal überschneiden, war eine Mehrfachmarkierung einzelner Zellen möglich. Nach Anfertigung der Bilder aller Substrukturen des MnPO und des OVLT bei 200-facher Vergrößerung wurden alle nNOS, Fos- und TB positiven Neurone sowie die doppelt bzw. dreifach markierten Neurone mittels Software-gestützter Zählfunktion erfasst, welche gezählte Zellen digital markierte und so eine Mehrfachzählung verhinderte. Mit Hilfe der Software „Metamorph“ wurden die SW-Aufnahmen gleichen Ausschnitts der Farbe ihrer Emissionswellenlänge entsprechend eingefärbt und digital überlagert. So konnten zellspezifische Co-Lokalisationen von nNOS, Fos und TB dargestellt werden. Die jeweilige Anzahl nNOS und/oder Fos und/oder TB -positiver Neurone wurde in 3 - 5 seriellen Coronalschnitten für das OVLT

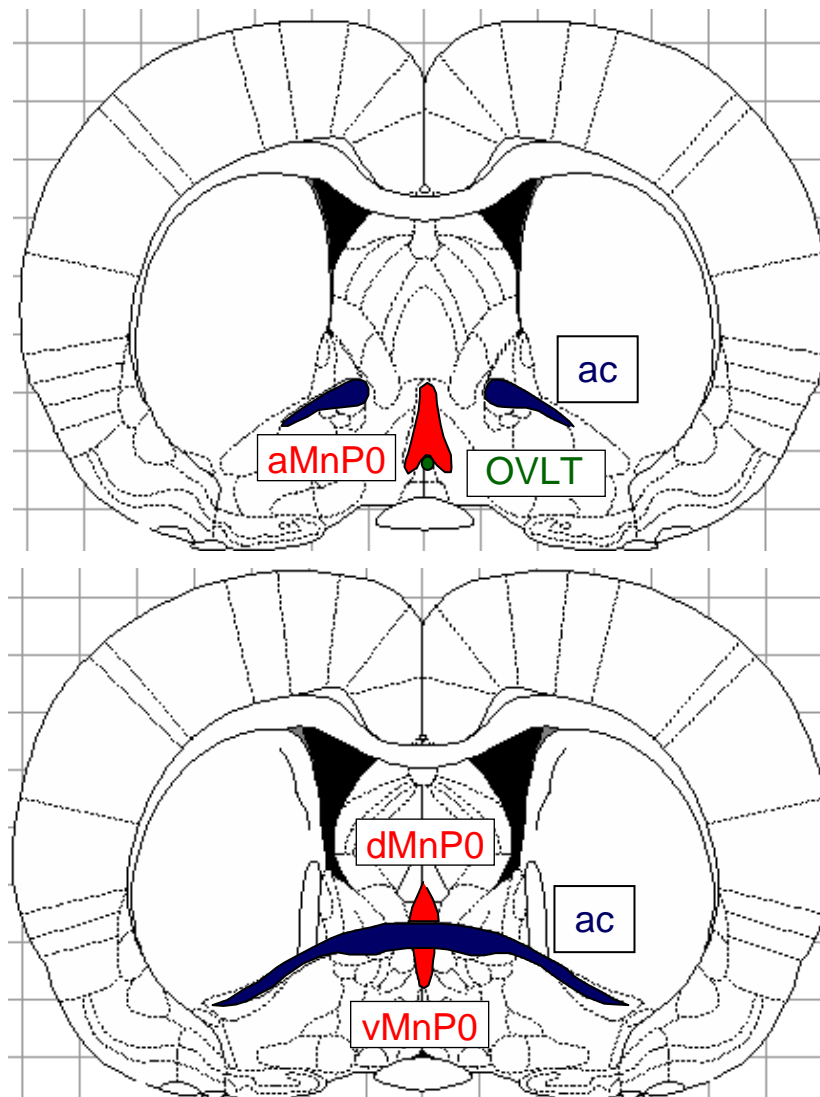


Abb. 11: Schematische Darstellung der Substrukturen des MnPO.

aMnPO: anteriorer MnPO, dMnPO: dorsaler MnPO, vMnPO: ventraler MnPO, OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*; ac: *Commissura anterior*. Schnittebene nach Paxinos & Watson 2006: oben *Bregma* 0,0 mm; unten *Bregma* -0,12 mm.

sowie die drei Substrukturen des MnPO erfasst und, bezogen auf einen Gehirnschnitt, als arithmetischer Mittelwert (MW) mit Standardfehler für jedes Tier errechnet. Die ermittelten Zellzahlen der verschiedenen Tiergruppen (A - D), sowie einer nicht stimulierten Kontrollgruppe wurden graphisch als arithmetischer Mittelwert der Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests. Bei der

Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $2p \leq 0,05$ gewählt.

2.4.6. Primäre Zellkultur des MnPO der Ratte

Als Zelllinien werden Zellkulturen nach der ersten Passage benannt, das heißt dem Transfer von Zellen von einem Kulturgefäß in ein anderes. Die primäre Zellkultur ist definiert als das *in vitro* Wachstum von Zellen, welche aus dem elterlichen Gewebe nach spontaner Auswanderung oder durch mechanische oder enzymatische Vereinzelung gewonnen wurden (Freshney, 1990). Primärkulturen repräsentieren somit Zell-, Gewebe- oder Organkulturen nach ihrer Entnahme aus dem Organismus und vor der ersten Passage. Dabei zeigen Zellen aus Primärkulturen trotz möglicher Transformation morphologische und funktionelle Ähnlichkeiten zum entsprechenden Zelltyp im intakten Gewebeverband und heben sich somit von etablierten, mehrmals passagierten Zelllinien ab (Morgan & Darling, 1994). Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts machte man sich Gewebekulturen zunutze, um das Verhalten einzelner Zellen unter definierten Bedingungen zu studieren (Freshney, 1990). In den Neurowissenschaften stellt die primäre, neurogliale Zellkultur eine wichtige Möglichkeit dar, einzelne Zellen aus definierten Gehirnstrukturen im Hinblick auf ihre Morphologie, vor allem aber jedoch ihre biochemischen, pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften zu charakterisieren (Gebke *et al.*, 1998, 2000; Jurzak *et al.*, 1994, 1995). Nach der Isolation des gewünschten Gewebes aus dem Organismus müssen dessen Zellen enzymatisch und/oder mechanisch aus dem Gewebeverband gelöst werden.

2.4.6.1. Vorbereitung der Zellkulturkammern

Die verwendeten Zellkulturkammern bestanden aus einer runden Flexiperm[®]-Mikrokammer (Grundfläche 28 mm²), deren Boden ein mit eingeätztem Koordinaten-System versehenes Deckgläschen (Cellocate[®]) darstellte. Das Deckgläschen wurde auf die Unterseite der Flexiperm[®]-Mikrokammer aufgelegt und leicht angedrückt. Entsprechende optische Eigenschaften der Cellocate[®] Deckgläschen ermöglichten die Ratio-Imaging Studien zur Bestimmung der intra-

zellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) einzelner MnPO-Zellen. So sollte die Adhäsionsmatrix der Zellen eine hohe Durchlässigkeit für monochromatisches Licht variabler Wellenlänge (300 - 400 nm) bei vernachlässigbarer sphärischer und chromatischer Aberration aufweisen. Um die Adhäsion und nachfolgende Differenzierung der Zellen zu begünstigen, wurden die Kammern zur Beschichtung mit 20 µl Poly-L-Lysin gefüllt und für 12 Std lichtgeschützt und steril bei 4°C inkubiert.

2.4.6.2. Präparation des *Nucleus medianus praeopticus*

Für jede Präparation wurden 5 - 6 neonatale Ratten (4 - 6 Tage alt) mit einer scharfen Schere rasch dekapitiert und der Kopf jeweils für ≤ 20 sec in 4°C kaltes Äthanol (70 %) zur Oberflächendesinfektion überführt. Sowohl die Kopfhaut als auch die Schädelkalotte wurden mit einer Irisschere eröffnet und abgehoben. Das freiliegende Gehirn wurde mit einem sterilen Spatel von den Hirnnerven getrennt, vorsichtig entnommen und in eine Petrischale (Ø 3 cm) mit GBSS (Kap. 2.3.2.2) überführt. Das Vorderhirn (*Tel-* und *Diencephalon*) wurde mit seiner caudalen Schnittfläche mittels Gewebekleber auf einem Teflon-Block fixiert, welcher in eine Kammer aus Polyethylen (5 x 8 x 12 cm H x B x L) mit oxygeniertem, 4°C kaltem GBSS eingesetzt wurde. Diese wurde in die Schiene des Vibratoms eingelegt; vom Vorderhirn wurden coronale Serienschnitte (500 µm) angefertigt, wobei der den MnPO enthaltenden Schnitt in eine mit GBSS gefüllte Petrischale auf Eis überführt wurde. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Bereich des MnPO mit einer Augenschere präpariert und in eine weitere Petrischale auf Eis mit oxygeniertem HBSS (Kap. 2.3.2.3) überführt. Anschließend wurden die MnPO-Präparationen von 5 - 6 neonatalen Rattegehirnen in 2 ml einer Dispase-I haltigen Lösung (Kap. 2.3.2.4) verbracht und für 35 min bei 37°C inkubiert (Reaktionsröhrchen Vol. 12 ml), um interzelluläre Adhäsionsmoleküle zu disintegrieren. Aufgrund der milden proteolytischen Eigenschaften der Dispase-I erfolgte einerseits eine Dissoziation der MnPO-Fragmente, andererseits konnten Schädigungen der Zellmembran minimiert werden (Cruz *et al.*, 1997; Frangakis *et al.*, 1982; Frangakis & Kimelberg, 1984; Gebke *et al.*, 1998, 2000). Um die Dispase-Lösung nach beendeter Inkubation zu inaktivieren, wurde sie abpipettiert und die MnPO-Präparationen drei-

mal im Abstand von 10 sec mit je 2 ml Inaktivierungslösung (37°C) (Kap. 2.3.2.5) und anschließend dreimal im Abstand von 10 sec mit je 2 ml Kulturmedium „Neurobasal-Medium A“ (37 °C) (Kap. 2.3.2.1) gewaschen. Um noch vorhandene Zell-zu-Zell Kontakte final zu lösen, folgte der enzymatischen eine zusätzliche milde mechanische Dissoziation (Gebke *et al.*, 1998, 2000; Jurzak *et al.*, 1994). Mittels einer feuerpolierten Pasteur-Pipette wurden dazu die Gewebestücke durch vorsichtiges, rasches Auf- und Abpipettieren mechanisch zu einer Zellsuspension dissoziiert. Die zuvor vorbereiteten Mikro-Zellkammern wurden mit sterilem Wasser gespült, getrocknet und auf 37°C temperiert. Je 200 µl der Zellsuspension wurden in eine Mikrokammer pipettiert, durch Zugabe von 600 µl Kulturmedium aufgefüllt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium ausgetauscht, um vorhandenen Zelldetritus und zelluläre Stoffwechselendprodukte zu entfernen. Ein weiterer Wechsel fand am vierten Tag nach der Präparation statt. Am fünften Tag konnte mit den funktionellen Messungen begonnen werden (siehe Kap. 2.4.9). Da von einem geringfügigen Anteil an Fremdgewebe bei der beschriebenen Präparation des MnPO ausgegangen werden muss, wird im Folgenden von einer „MnPO-angereicherten“ neuroglialen Primärkultur gesprochen.

2.4.7. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Ratio-Imaging Technik

2.4.7.1. Grundlagen der Ratio-Imaging Technik

Die Ratio-Imaging Technik bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen ($[Ca^{2+}]_{iz}$) in einzelnen Zellen kontinuierlich zu messen (Baylor & Hollingworth, 2000; Hinman & Sammak, 1998). Damit stellt diese Methode eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der Transmitter-induzierten, intrazellulären Signaltransduktion in lebenden Zellen wie Neuronen oder Astrozyten in der Primärkultur dar (Gebke *et al.*, 2000; Jurzak *et al.*, 1995).

Das Äquorin der Leuchtqualle *Aequora forskolea* war der erste, wissenschaftlich in der Forschung eingesetzte Calciumindikator zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration im Rahmen der Kontraktion isolierter Muskelfasern

(Ashley & Ridgway, 1970). Um Änderungen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ messen zu können, macht man sich also seit fast 40 Jahren selektive, Ca^{2+} -chelierende Fluoreszenzfarbstoffe zunutze (Moreton, 1994). Heute steht eine große Anzahl solcher Fluoreszenzindikatoren zur Calcium-Messung zur Verfügung, wie beispielsweise Derivate des Calciumchelators EGTA (z.B. Quin-2, Indo-1, Fura-2), des Fluoresceins (z.B. Fluo-3) oder des Rhodamins (z.B. Rhod-2) (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Diese Farbstoffe werden in zwei Gruppen unterteilt, sogenannte *wavelength stable*- und *wavelength shifting* Fluoreszenzfarbstoffe. Bei den *wavelength stable* Fluoreszenzindikatoren, wie z.B. Quin-2, ändert sich durch Calciumbindung an den Indikator die Intensität des emittierten Lichtes bei gleich bleibender Wellenlänge sowohl für die maximale Anregung wie auch Emission. Mitglieder der Gruppe der *wavelength shifting* Farbstoffe ändern nach Calciumbindung die Intensität des emittierten Lichts in Abhängigkeit von der jeweiligen Wellenlänge der Exzitation (Moreton, 1994; Ross, 1989; Thomas & Delaville, 1991; Tsien, 1980, 1989; Tsien & Poenie, 1986) und erwiesen sich als besonders geeignet für die Bestimmung von $[Ca^{2+}]_{iz}$ aufgrund ihres experimentellen Einsatzes in geringen, nicht zellschädigenden Konzentrationen. Zu den *wavelength shifting* Fluoreszenzindikatoren gehört auch das in dieser Arbeit eingesetzte Fura-2 (Abb. 13), dessen Emissionsspektrum sich über einen Anregungsbereich von 250 - 450 nm *per se* und in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration ändert (Roe *et al.*, 1990; Tsien *et al.*, 1985; Tsien & Poenie, 1986). Das Anregungsoptimum des calciumfreien, polyanionischen Indikators Fura-2 liegt bei 363 nm; der mit Calcium gesättigte Farbstoff dagegen wird maximal durch Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt. Das Emissionsmaximum bleibt mit etwa 510 nm konstant (calciumfreies Fura-2: 512 nm, calciumbindendes Fura-2 505 nm) (Abb. 12) (Thomas & Delaville, 1991; Tsien & Poenie, 1986). In der Praxis wird zur Messung der Fluoreszenzintensität des calciumfreien Farbstoffes allerdings nicht die optimale Anregungswellenlänge (ARW) von 363 nm benutzt, sondern Licht einer Wellenlänge von 380 nm. Der Grund hierfür ist, dass eine Wellenlänge von 360 nm sehr nah am sogenannten isoemissiven Punkt des Fura-2 spezifischen Spektralverhaltens liegt, bei welchem die Fluoreszenzintensität des Fura-2 unabhängig von der Calciumkonzentration ist (Abb. 12). Bei einer ARW von 380 nm ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für Calcium-freies und -gesättigtes Fura-2 am größten. Bei der

Ratio-Imaging Technik wird der Quotient (Ratio) aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden ARWs (340 und 380 nm) gemessen. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wider (Tsien *et al.*, 1985).

Der Vorteil des Einsatzes der *wavelength-shifting* Fluoreszenzindikatoren gegenüber den *wavelength-stable* Indikatoren liegt in der Möglichkeit zur Ratio-bildung (Roe *et al.*, 1990). Imaging-Versuche können durch verschiedene Faktoren fehlerhaft beeinflusst werden. Bei der Ratiomessung wirken sich viele dieser Faktoren im gleichen Maß bei beiden Anregungswellenlängen aus und werden folglich bei der Quotientenbildung „herausgemittelt“. Die Messungen

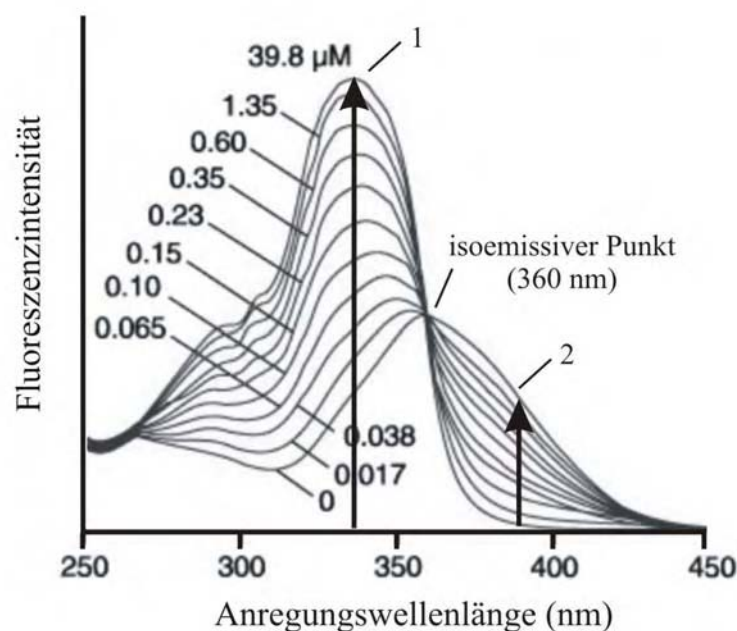


Abb. 12: Emissionsspektren von Fura-2 in Abhängigkeit von der vorhandenen Konzentration an freien Calciumionen

Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge ≥ 510 nm) von Fura-2 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm) in Anwesenheit steigender Konzentrationen an freien Calciumionen ($[Ca^{2+}]$ (μM)).

Kurve 1: bei etwa 40 μM an freiem Calcium ist Fura-2 vollständig mit Calcium gesättigt; Emissionsmaximum bei 340 nm ARW

Kurve 2: Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von freiem Calcium; Emissionsmaximum bei 363 nm ARW

Die Pfeile zeigen die Fluoreszenzintensitäten bei den beiden in der Praxis des Ratio-Imaging benutzten ARWs von 340 und 380 nm. Hier ist jeweils die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca^{2+} -freies und -gesättigtes Fura-2 am größten.

werden so beispielsweise unabhängig von der intrazellulär vorhandenen Menge an Indikatorsubstanz, einer eventuell ungleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs sowie der Zelldicke und den Effekten des Ausbleichens („*photo bleaching*“) oder Austretens des Farbstoffes (Roe *et al.*, 1986; Tsien & Poenie, 1986; Tsien *et al.*, 1985). Gemäß dem Massenwirkungsgesetz verhält sich die Ratio proportional zur Konzentration an vorhandenem freien bzw. gebundenen Calcium. Aus der im Versuch gemessenen Ratio (Emission (ARW 340 nm) / Emission (ARW 380 nm)) kann mit Hilfe folgender Gleichung die absolute, intrazelluläre Calciumkonzentration errechnet werden (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}] = KD \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Formellegende:

KD = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Calcium (= 25 µM/L)

R = gemessene Ratio (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW)

R_{min} = Ratio bei calciumfreiem Fura-2

R_{max} = Ratio bei calciumgesättigtem Fura-2

S_{f2} = Emissionswerte des calciumfreien Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

S_{b2} = Emissionswerte des calciumgesättigten Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

2.4.7.2. Der Einsatz von Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester in der Primärkultur

Um die Responsivität von Neuronen und Astrozyten der MnPO-angereicherten Primärkultur auf wichtige Neuromodulatoren wie Angiotensin II (AngII), Glutamat oder Noradrenalin (NA) im Rahmen der hypothalamischen Kontrolle homöostatischer Regelkreise anhand einer transienten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ zu untersuchen, wurde Fura-2 als Indikatorfarbstoff gewählt (Abb. 13). Bei Fura-2 handelt es sich um ein stark negativ geladenes Molekül, welches daher nicht in der Lage ist, Zellmembranen zu permeieren. Um eine Farbstoffbeladung der zu untersuchenden Zellen ohne Schädigung der Zellmembran zu ermöglichen, wurde ein Acetoxymethylester des Fluoreszenzindikators (= Fura-2 AM) einge-

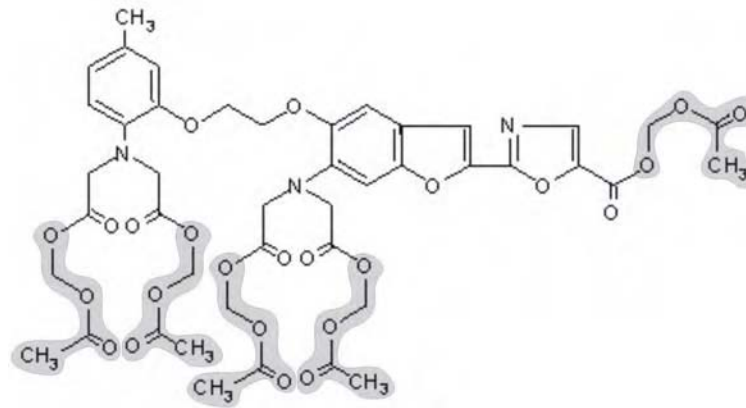


Abb. 13: Strukturformel des Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM)

Die grau hinterlegten Bereiche des Moleküls werden in der Zelle durch zytoplasmatische Esterasen abgespalten. Fura-2 wird so membranimpermeabel und kann durch ionische van-der Waals Kräfte als aktive Form Ca^{2+} Ionen binden.

setzt. Fura-2 AM ist lipophil und somit membran-permeabel, kann allerdings keine Calciumionen binden. In der Zelle wird Fura-2 AM durch zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. Freies Fura-2 ist nicht membranpermeabel und kann an seinen negativ geladenen Carboxylgruppen zweiwertige Kationen, vor allem freies Ca^{2+} binden (Tsien & Poenie, 1986).

Zur Beladung der zu untersuchenden Zellen der Primärkultur mit Fura-2 wurde die Zellkulturkammer mit 0,9 ml Medium gefüllt, welches 2 $\mu\text{M/L}$ Fura-2 AM enthielt. Fura-2 AM wurde als 1 mM/L Stammlösung in DMSO bei -24°C gelagert und somit im Zellkulturmedium 1 : 500 verdünnt eingesetzt. Während der 35 min Inkubation bei RT unter Ausschluss von Licht erfolgte die zelluläre Aufnahme des Indikators. Im Anschluss an die Inkubation wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 μl Messpuffer (Kap. 2.3.3.1) überschüssiges Fura-2 AM aus der Kammer entfernt.

2.4.8. Der Messstand für die Calcium-Imaging Versuche

Die Ratio-Imaging Versuche zur kontinuierlichen Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ in der neuroglialen Zellkultur des MnPO wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop mit Epifluoreszenz-Setup durchgeführt (Abb. 14). Die Monochroma-

toreinheit zur Anregung des Fluorophors Fura-2 wurde über ein Software-Protokoll gesteuert. Als Lichtquelle diente eine in die Einheit integrierte Xenonlampe. Die gewünschten Wellenlängen wurden mit Hilfe von Spiegeln, Linsen und einem Beugungsraster erzeugt und anschließend über ein Lichtleiterkabel und einen Epifluoreszenz-Kondensor zum Mikroskop weitergeleitet. Dort wurde das ankommende Anregungslicht (alternierend: 340 und 380 nm) über einen dichroischen Spiegel durch das Objektiv auf die Zellpräparation reflektiert. Angeregtes Fura-2 emittierte längerwelliges Licht, welches den dichroischen Spiegel und einen Emissionsfilter zur CCD (charge-coupled device)-Kamera durchdrang, welche das Lichtsignal erfasste. Daraufhin wurde das entstandene Bild von der CCD-Kamera alle 5 sec an den Computer übermittelt. Über die TillVision-Software konnten die Belichtungszeit sowie die zeitlichen Abstände zwischen den Belichtungen reguliert werden. Die bei den unterschiedlichen ARWs (Fura-2: 340 / 380 nm) dokumentierten Bilder wurden mit Hilfe der systemeigenen Software quantifiziert. Bei den daraus resultierenden Werten, wurde der Quotient (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW) gebildet, welcher im Folgenden als Ratio angegeben wird.

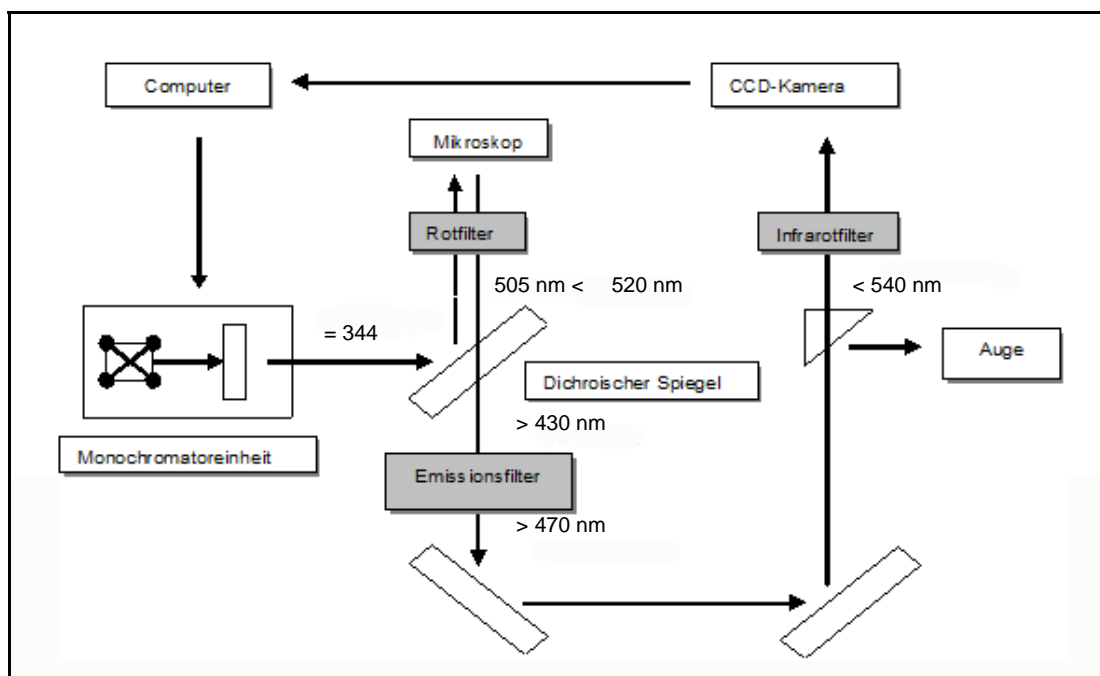


Abb. 14: Schematische Darstellung des Imaging-Setup

2.4.9. Vorbereitung der Versuchsdurchführung

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die mit Fura-2 beladenen Zellen in das Messsystem verbracht. Zur Fixation des CELLocate[®] Deckglases mit den adhären Zellen wurde die Flexiperm-Kammerwandung entfernt und das CELLocate[®] auf die mittige Öffnung einer runden Stahlscheibe positioniert, welche als Basis der Messkammer diente (Abb. 15). Zur Befestigung wurde ein Teflonring, der gleichzeitig die Außenwand der Messkammer bildete, mit vier Schrauben auf der Scheibe fixiert. Die Messkammer konnte nun in eine hierfür vorgesehene Öffnung des Mikroskoptisches eingesetzt werden. Nach Montage der Messkammer wurde diese sofort mit 800 µl Messpuffer bei RT gefüllt. An die Messkammer wurden Zu- und Abfluss einer Schlauchpumpe in Form von gebogenen Kanülen angeschlossen. Die Kanüle, über die der Messpuffer in die Kammer geleitet wurde, reichte bis zum Boden der Kammer, während die Abflusskanüle lediglich die Flüssigkeitsoberfläche berührte. Mit Hilfe der Schlauchpumpe wurde Messpuffer bzw. die in Messpuffer gelösten Testsubstanzen mit einer Flussrate von 2 ml/min aus Reservoirs (Applikationsspritzen) durch die Messkammer geleitet. So konnte eine konstante Füllung der Messkammer und ein kontinuierlicher Pufferwechsel bei minimaler Turbulenz gewährleistet werden. Das Totraumvolumen des Superfusionssystems sowie die rasche, homogene Durchmischung des Perfusats mit dem Kammervolumen ließ sich durch Farbstoffapplikation (Trypanblau) bestimmen bzw. nachweisen.

2.4.10. Versuchsdurchführung

2.4.10.1. Messprotokolle für das Ratio-Imaging

Mit Hilfe des Imaging-Filters wurde bei einer Belichtungszeit von 150 ms und einer Wellenlänge von 380 nm ein Bild der Fura-2 beladenen Zellen im Gesichtsfeld erstellt und mittels Durchlichtbild deren Lokalisation im Koordinatensystem des CELLocate[®] Deckglases dokumentiert. Zellen, die gut differenziert erschienen und keine ersichtlichen Zellkontakte zu andere Zellen aufwiesen, wurden als „region of interest“ (ROI) markiert und fortlaufend nummeriert (Abb. 16), so dass die Messung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ für jede markierte Zelle getrennt

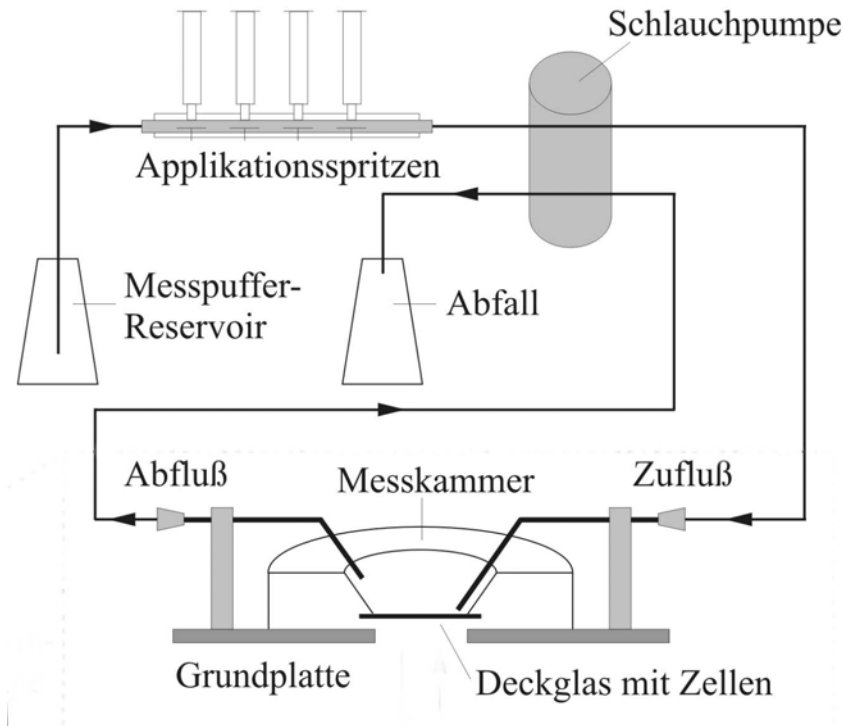


Abb. 15: Schematische Darstellung der Messkammer

möglich war. Die Ermittlung der Ratio-Werte erfolgte im Abstand von 5 sec bei einer Belichtungszeit von jeweils 150 ms. Die Testsubstanzen wurden als konzentrierte Aliquots bei -20°C gelagert und erst unmittelbar vor der Messung aufgetaut. Je nach Konzentration der eingefrorenen Stocklösungen und gewünschter Endkonzentration der Substanzen wurden erstere mit Messpuffer entsprechend verdünnt und in 50 ml Reaktionsgefäße pipettiert, welche über ein Schlauchsystem mit der Messkammer in Verbindung standen. Durch Umschalten der entsprechenden 3-Wege-Hähne einer Hahnenbank wurde von Messpuffer auf substanzhaltigen Puffer umgeschaltet und dieser in die Kammer geleitet. Nach 10 min Superfusion mit Messpuffer begann die Superfusionsstimulation mit randomisierter Reihenfolge der verschiedenen Neuromodulatoren bzw. Neurotransmitter / Rezeptoragonisten. Der jeweils 3-minütigen Stimulation folgte eine 8-minütige Auswaschphase mit Messpuffersuperfusion. Nach Abschluss der jeweiligen Messung wurde das zellbeladene CELLocate[®] Glas in einer Multiwell-Platte für 15 min in 4°C kaltem PFA fixiert und anschließend in PBS bis zu ihrer immunzytochemischen Identifikation aufbewahrt.

2.4.10.2. Versuchsserie I

Noradrenalin repräsentiert *in vivo* einen wichtigen Neurotransmitter zur Signalübertragung etwa eines systemischen Blutdruckabfalles oder einer extrazellulären Hypovolämie über Strukturen der *Medulla oblongata* u.a. an den MnPO

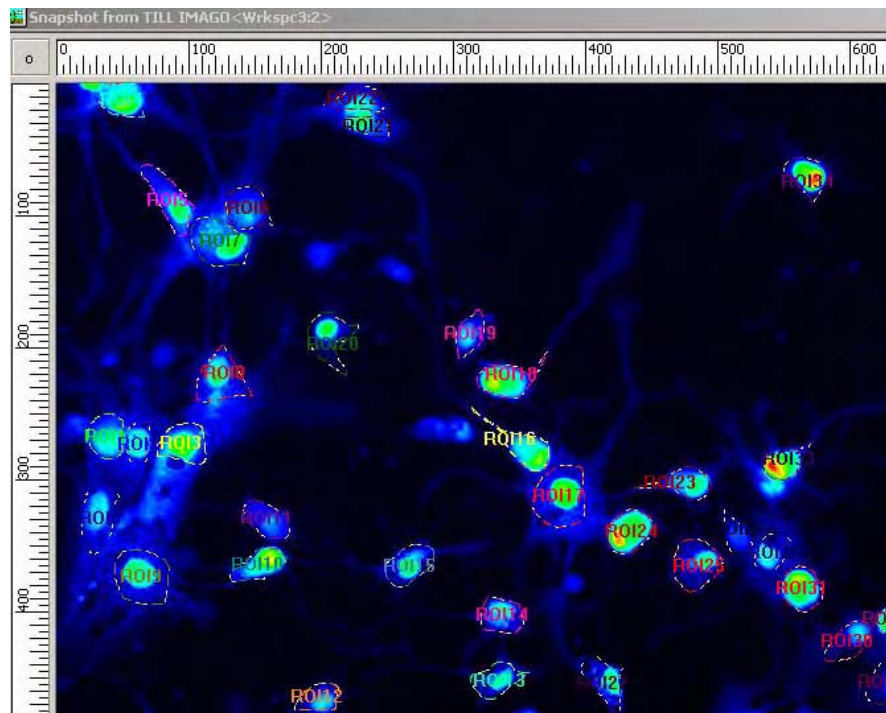


Abb. 16: Fura-2 beladene Zellen der MnPO Primärkultur

Zellen der MnPO Primärkultur wurden für den Nachweis einer Transmitter-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei einer ARW von 380 nm und Belichtung nach 150 ms Belichtungszeit auf einem Bildschirm dargestellt. Durch Markierung einzelner Zellen wurden „regions of interest“ (ROI-X) für die Durchführung des Ratio-Imaging Experiments definiert.

der *Lamina terminalis*. Zur Untersuchung einer calciumvermittelten Signaltransduktion durch Noradrenalin (NA) in Neuronen und Astrozyten der Primärkultur des MnPO wurden diese deshalb mit NA im Superfusat (10^{-6} M/L) bei RT für 3 min stimuliert, wobei eine Wiederholbarkeit der Antwort getestet wurde, um Desensibilisierungs-Phänomene zu erfassen. Weiterhin erfolgte eine pharmakologische Charakterisierung der noradrenerg induzierten Erhöhung des intrazellulären Calciums durch eine Stimulation der Zellen mit dem α_1 -Rezeptor-subtyp-spezifischen Agonisten Phenylephrin, der ebenfalls in einer Konzentration von 10^{-6} M/L eingesetzt wurde; dabei wurden NA und Phenylephrin se-

quentiell und randomisiert eingesetzt. In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob Prazosin als selektiver Antagonist für α_1 -Adrenozeptoren die NA-vermittelte, calciumabhängige Signaltransduktion unterdrücken kann. Nach erfolgter Kontrollstimulation mit NA (3 min), wurden die Zellen nach 1-minütiger Vorstimulation mit Prazosin im Superfusat (10^{-7} M/L) zeitgleich mit NA und Prazosin superfundiert (3 min). Nach Auswaschen des Agonisten und Antagonisten (8 min) erfolgte ein abschließender Kontrollstimulus mit NA (3 min). Im Anschluss daran wurde eine 8-minütige Äquilibration der Zellkultur mit Messpuffer durchgeführt, gefolgt von einer 3-minütigen Stimulation mit Glutamat (10^{-5} M/L). Nach einer weiteren Äquilibrationsphase (8 min) folgte die Superfusion mit Kalium-reichem Messpuffer (50 mM/L) für 3 min.

2.4.10.3. Versuchsserie II

Nachdem in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass AngII als peptiderger Neurotransmitter u.a. zur Übertragung osmotischer Informationen aus der EZF über das SFO zum MnPO dient, sollte in der vorliegenden Arbeit zum einen untersucht werden, ob AngII auch in den Zellen der MnPO-angereicherten Primärzellkultur eine Calcium-vermittelte Signalübertragung induzieren kann. Des weiteren sollte überprüft werden, ob eine funktionelle Co-Expression von AngII-spezifischen Rezeptoren und Adrenozeptoren für einzelne Neurone und/oder Astrozyten besteht. Dies würde Rückschlüsse auf deren Interaktion im Rahmen der Osmo- und Thermoregulation zulassen. Deshalb wurden die Zellen nach Messprotokoll (siehe Kap. 2.4.10.1) mit AngII (10^{-6} M/L) und NA (10^{-6} M/L) sequentiell stimuliert. Im Anschluss daran erfolgte eine 8-minütige Superfusion mit Messpuffer, der eine 3-minütige Stimulation mit Glutamat (10^{-5} M/L) folgte. Nach erneuter Äquilibration mit Messpuffer für 8 min wurden die Zellen durch Kalium-reichem Messpuffer (50 mM/L) für 3 min depolarisiert.

2.4.10.4. Immunzytochemie an der Primärzellkultur des MnPO zum Nachweis zelltypspezifischer Marker, Enzyme und Rezeptoren

Die Detektion der in der Primärkultur kultivierten Neurone erfolgte durch Einsatz eines MAP 2a+b spezifischen Antikörpers, während Astroglia mit Hilfe eines

polyklonalen primären Antiserums gegen GFAP charakterisiert wurde. Des weiteren wurde eine Identifizierung nitrerger Neurone durch den Einsatz eines nNOS-spezifischen, polyklonalen Antikörpers vorgenommen. Zum Nachweis NA-responsiver Zellen diente die Verwendung des α_1 -Adrenoceptor-spezifischen Antikörpers. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten in einer Multiwell-Platte. Nach vorangegangener Fixation (Kap. 2.4.10.1) erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen im Zellkultur-Inkubationspuffer (Kap. 2.3.1.8) für 1 h bei RT. Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen in Zellkultur-Inkubationspuffer gelöst und eingesetzt:

| | |
|---|--------|
| Goat-anti-glial fibrillary acidic protein | 1: 500 |
| Mouse-anti-MAP (2a+2b) | 1: 600 |
| Rabbit-anti-nNOS | 1:1000 |
| Rabbit- anti- α_1 -adrenergic receptor | 1: 500 |

Nach 48-stündiger Inkubation bei 4°C folgte ein 3 x 5 min Waschschritt mit Waschpufferlösung (Kap. 2.3.1.9) und anschließender Einsatz der in Zellkultur-Inkubationspuffer gelösten Sekundärantikörper in folgenden Verdünnungen:

| | |
|--|--------|
| Alexa [®] 488- donkey-anti-goat IgG | 1: 800 |
| AMCA-donkey-anti-mouse IgG | 1: 800 |
| Cy3 [™] -donkey-anti-rabbit IgG | 1: 800 |

Nach 60-minütiger Inkubation wurden die zellbeladenen CELLocate[®] von überschüssiger Antikörperlösung befreit und abschließend in entionisiertes Reinstwasser getaucht, um Kristallisation von Puffersalzen auf der Glasoberfläche zu vermeiden. Auf einen Objektträger wurden 10 μ l Citifluor[®] pipettiert und die CELLocate[®] „upside down“ aufgelegt. Mittels des eingetätzten Rasters auf dem CELLocate[®] und einem digitalen Bild der fluoreszierenden Zellen konnte eine eindeutige Typisierung der im Calcium-Imaging charakterisierten Zellen (ROIs) vorgenommen werden (Abb. 17).

1.4.10.5. Auswertung der Ratio-Imaging Untersuchungen

Der Anstieg der Fluoreszenzintensität des intrazellulären Fura-2-AM in den Zellen der Primärkultur wurde mit Hilfe eines bildgebenden, computergestützten Verfahrens, mit welchem mehrere Zellen gleichzeitig erfasst werden konnten

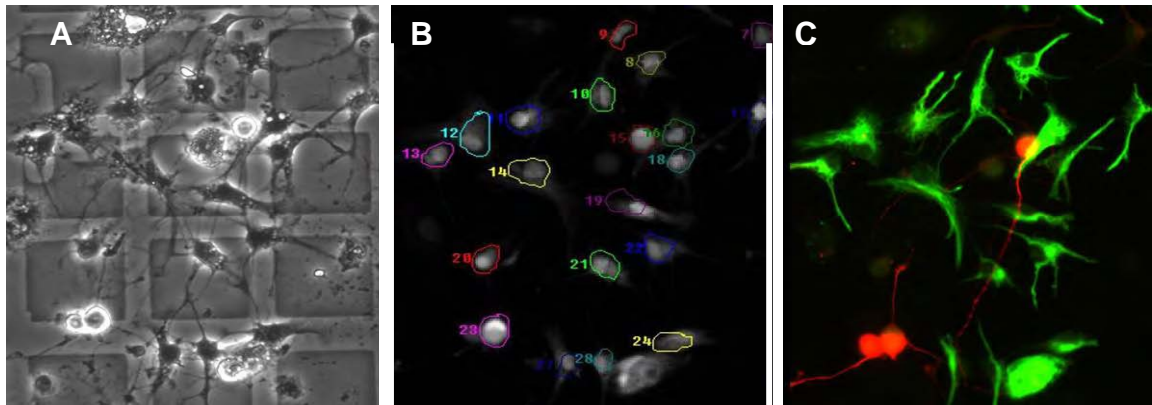


Abb. 17: Immunzytochemische Identifikation der gemessenen ROIs

- A:** Durchlichtbild des zu messenden Zellclusters auf CELLocate®
B: Fluoreszenzbild des Fura-2 beladenen Zellclusters mit markierten ROIs
C: Immunzytochemische Charakterisierung der Primärkultur mittels spezifischer Zellmarker; rot: MAP2a+b, grün: GFAP

(ROIs), bestimmt. Die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität erfolgte in Nicht-Echtzeit auf Einzelzellniveau. Die durch die CCD-Kamera gemessenen Intensitätswerte der Lichtemission bei 510 nm nach Anregung einzelner Fura-2 beladener Zellen mit den für Fura-2 spezifischen Wellenlängen von 340 und 380 nm wurden wechselweise in den Computer eingelesen. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Fluoreszenz-Intensitäten alle fünf Sekunden gemessen (= 0,2 Hertz). Der vom Computer ermittelte Quotient (340 nm / 380 nm Ratio) wurde in Abhängigkeit von der Zeit in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die gemessenen Werte wurden gespeichert und zur Bearbeitung und Darstellung in das Programm „Graph Pad Prism®“ exportiert.

Für jeden neuromodulatorischen Transmitter (AngII, NA, Glutamat) wurde prozentual ermittelt, wie viele der untersuchten Zellen stimuliert werden konnten. Bei der Auswertung wurden nur solche Zellen berücksichtigt, welche am Ende einer Versuchsreihe auf Stimulation mit Glutamat oder Kaliumchlorid mit einer Erhöhung der Ratio reagierten. Für die reagierenden Zellen wurden der arithmetische Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) der Ratio-Änderung errechnet. Die Daten wurden mit Hilfe des Computer-Programms „Graph Pad Prism“ in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Mit selbiger

Software wurden statistische Untersuchungen durchgeführt und die MW der Ratio-Änderungen innerhalb einer Versuchsserie statistisch miteinander verglichen. Als statistischer Test wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U Rangtest gewählt.

3. Ergebnisse

3.1. Physiologische Ganztierversuche

3.1.1. Telemetrie Versuchsgruppe A: Thermische Stimulation

3.1.1.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur

Bei einem Licht : Dunkel Wechsel von 12 : 12 Stunden erfolgte die Aufzeichnung der Körperkerntemperatur (KT) über 96 Stunden, beginnend mit der ersten Lichtphase. Der zeitliche Verlauf der KT wird in Abb. 18 als Kurvendia-gramm der 1-Stundenmittelwerte (1-Std-MW) und in Abb. 19 als Balkendia-gramm der 6-Stundenmittelwerte (6-Std-MW) dargestellt.

Bei einer Raumtemperatur (RT) von 23°C während der ersten 48 Stunden (= Kontrollphase) wies der zeitliche Verlauf der KT eine typisch circadiane Rhyth- mik zwischen Tag- und Nachtphasen mit höheren Werten während der letzteren auf und ist anhand von 1-Std-MW in Abb. 18 dargestellt. Während der ersten Tagphasen (Stunden 1-6 bzw. 25-30) lagen die gemessenen 1-Std-MW zwi- schen $37,23 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ und $37,46 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,17 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ und $38,30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (Tag 2), entsprechend 6-Std-MW von $37,38 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,60 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) (Abb. 19). In der zweiten Tageshälfte (Stunden 7- 12 bzw. 31-36) schwankten die gemessenen 1-Std-MW zwischen $37,26 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$ und $38,00 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,33 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ und $37,76 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) (Abb. 18), und ergaben 6-Std-MW von $37,55 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,62 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) (Abb. 19), welche im Vergleich zur jeweils ersten Tageshälfte keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Abb. 19).

Für die erste Nachphase (Stunden 13-18 bzw. 37-42) ergaben sich bei 1-Std- MW zwischen $37,86 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ und $38,37 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,89 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ und $38,35 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) 6-Std-MW von $38,07 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $38,16 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) (Abb. 19). Für die zweite Nachphase (Stunden 19-24 bzw. 43- 48) konnten bei 1-Std-MW zwischen $37,93 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ und $38,42 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,69 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ und $38,03 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) für die 6-Std-MW Körpertem- peraturen von $38,09 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ (Tag 1) bzw. $37,92 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ (Tag 2) errechnet

werden (Abb. 19). Die 6-Std-MW der Nachtphasen erwiesen sich im Bezug auf die ermittelten Temperaturen der jeweils ersten Tagphasen (Tage 1 und 2) als signifikant ($2p \leq 0.01$) erhöht.

Bei einer Erhöhung der Raumtemperatur auf 30°C während der zweiten 48 Stunden (= experimentelle Phase) blieb die circadiane Rhythmik der KT sowohl am ersten als auch am zweiten Tag der Wärmeexposition, und somit der signifikante Unterschied zwischen Tag- und Nachtphasen ($2p \leq 0,01$), erhalten (Abb. 18, 19). Die 1-Std-MW des dritten Versuchstages schwankten zwischen $37,51 \pm 0,03^\circ\text{C}$ und $37,98 \pm 0,03^\circ\text{C}$ (Tag 3, Stunden 49-54) bzw. $37,41 \pm 0,01^\circ\text{C}$ und $38,03 \pm 0,12^\circ\text{C}$ (Tag 3, Stunden 55-60). In den beiden Nachtphasen konnten 1-Std-MW zwischen $37,78 \pm 0,06^\circ\text{C}$ und $38,59 \pm 0,14^\circ\text{C}$ (Tag 3, Stunden 61-66)

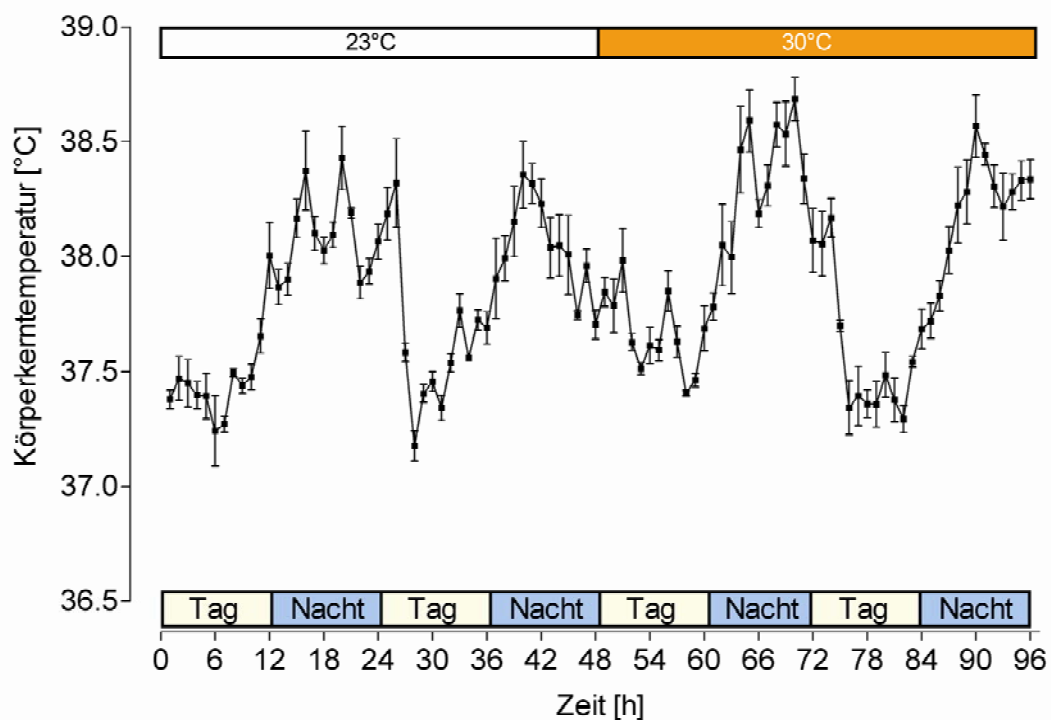


Abb. 18: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Körperkerntemperatur (KT) der Versuchsgruppe A

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der Körperkerntemperatur eines jeden Tieres der Versuchsgruppe A wurden jeweils arithmetische 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

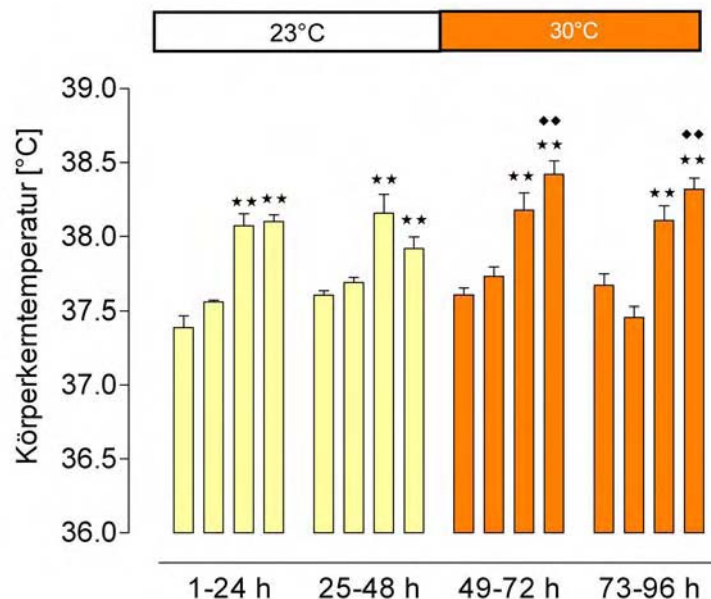


Abb. 19: Darstellung der 6-Std-MW der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe A

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe A wurden zum statistischen Vergleich arithmetische 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages, Rauten (♦) für den Vergleich zwischen Tag- bzw. Nachtphasen bei 30°C Raumtemperatur (RT) zu jeweils entsprechenden Phasen bei 23°C RT. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (**,♦♦ 2p≤0,01) (n=5).

bzw. $38,07 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ und $38,69 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 67-72) ermittelt werden. Am vierten Versuchstag bewegten sich die 1-Std-MW der beiden Tagesphasen zwischen $37,34 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ und $38,17 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 73-78) bzw. $37,29 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ und $37,69 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 79-84). In den Nachtphasen betrugen die 1-Std-MW von $37,72 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ bis $38,57 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 85-90) und $38,22 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ bis $38,44 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 91-96). Die errechneten 6-Std-MW der ersten und zweiten Tagesphase des dritten Versuchstages von $37,60 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 49-54) und $37,73 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 55-60) bzw. des vierten Versuchstages von $37,66 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 73-78) und $37,45 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 79-84) zeigten keinen Unterschied zu den bei 23°C RT erhaltenen Werten. Sowohl die 6-Std-MW der beiden Nachtphasen des dritten Versuchstages von $38,18 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 61-66) und $38,41 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 67-72), als auch

die des vierten Versuchstages von $38,1 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 85-90) und $38,31 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 91-96) erwiesen sich jeweils als signifikant erhöht verglichen mit der zugehörigen ersten Tagesphase ($2p \leq 0,01$), vor allem aber auch mit den KT-Werten der aktiven Dunkelphase der Prästimulationsperiode bei 23°C RT ($2p \leq 0,01$) (Abb. 19).

3.1.1.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität

In den beiden Prästimulationstagen bei 23°C RT zeigte der Verlauf der lokomotorischen Aktivität der Versuchstiere die physiologische circadiane Rhythmik zwischen Licht- und Dunkelphase (Abb. 20). Dabei nahmen die additiv aus 12 5-min Werten ermittelten 1-Std-MW Aktivitätswerte (ac) schon während der zweiten Tagphase (Stunden 7-12) zu. Im 6-Std-MW ergaben sich jedoch keine signifikanten Erhöhungen im Vergleich zur ersten Tagesphase (Abb. 21). In den ersten beiden Tageshälften (Stunden 1-6 bzw. 25-30) wurden mittlere Aktivitäten zwischen 63 ± 19 ac und 100 ± 48 ac bzw. 38 ± 21 ac und 118 ± 36 ac, in den zweiten Tagesphasen (Stunden 7-12 bzw. 31-36) zwischen 57 ± 18 ac und 291 ± 50 ac bzw. 40 ± 10 ac und 183 ± 17 ac gemessen, welches jeweils einem kumulativen 6-Std-MW von 493 ± 109 (Tag 1, Stunden 1-6) und 920 ± 159 ac (Tag 1, Stunden 7-12) bzw. 445 ± 89 ac (Tag 2, Stunden 25-30) und 727 ± 105 ac (Tag 2, Stunden 31-36) entsprachen (Abb. 21).

Im Gegensatz dazu zeigte sich die erwartet höhere Aktivität in den beiden Nachtphasen des ersten und zweiten Tages (Stunden 13-18 und 19-24 bzw. 37-42 und 43-48). Während in den ersten Hälften der Dunkelphasen die mittleren Aktivitäten zwischen 110 ± 19 ac und 224 ± 64 ac (Tag 1 Stunden 13-18) bzw. 93 ± 43 ac und 369 ± 128 ac (Tag 2, Stunden 37-42) schwankten, bewegten sich die gemessenen activity counts (ac) der zweiten Nachthälften zwischen 29 ± 12 ac und 231 ± 56 ac (Tag 1, Stunden 19-24) bzw. 42 ± 16 ac und 280 ± 86 ac (Tag 2, Stunden 43-48). Vergleicht man die ermittelten kumulativen 6-Std-MW dieser zwei Phasen, 959 ± 144 ac (Tag 1, Stunden 13-18) und 1249 ± 263 ac (Tag 2, Stunden 37-42) bzw. 862 ± 129 ac (Tag 1, Stunden 19-24) und 930 ± 70 ac (Tag 2, Stunden 43-48), mit denen der ersten Tagesphase

(Stunden 1-6), so ließ sich für die ersten Nachtphasen von Tag 1 und 2 eine signifikante Erhöhung der Aktivität feststellen ($2p \leq 0,05$) (Abb. 21).

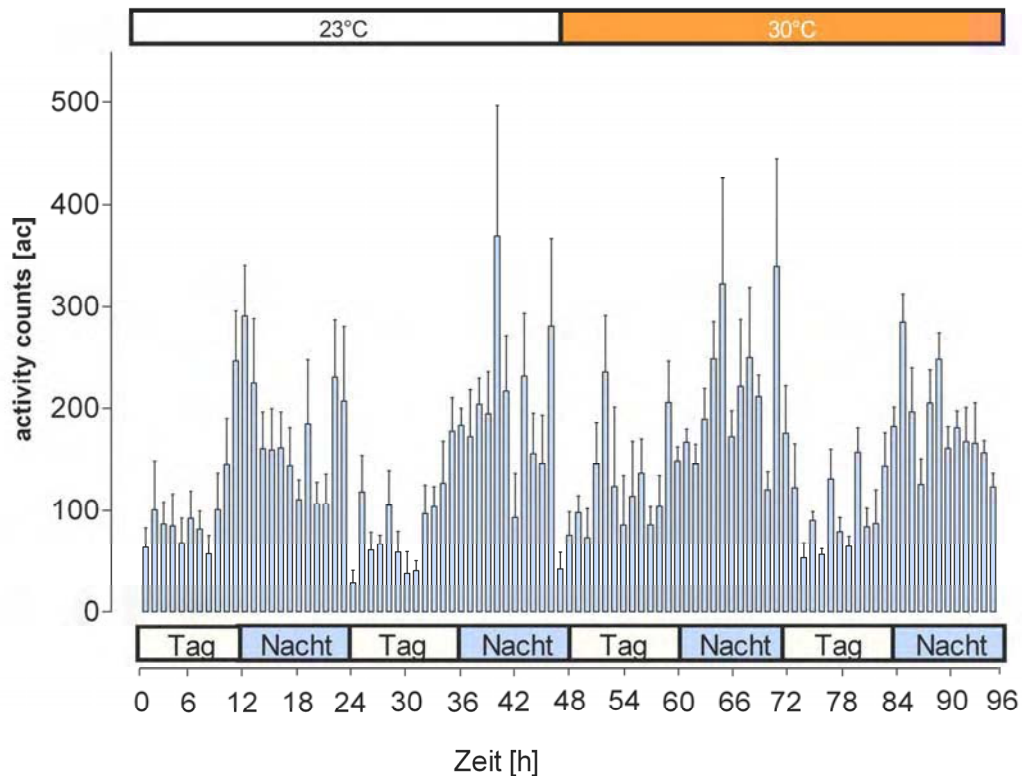


Abb. 20: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe A

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der lokomotorischen Aktivität eines jeden Tieres der Versuchsgruppe A wurden jeweils kumulative 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

Nach der 48-stündigen Prästimulationsphase wurde die Raumtemperatur auf 30°C erhöht und der Einfluss auf die lokomotorische Aktivität dokumentiert. Die als zwischen 85 ± 18 ac und 236 ± 56 ac (Tag 3, Stunden 49-54) bzw. 53 ± 15 ac und 122 ± 43 ac (Tag 4, Stunden 73-78) liegend errechneten 1-Std-MW und die daraus resultierenden kumulativen 6-Std-MW von 760 ± 221 ac (Tag 3, Stunden 49-54) bzw. 530 ± 89 ac (Tag 4, Stunden 73-78) der ersten 6-Stunden Perioden der Lichtphase des ersten und zweiten Stimulationstages zeigten keinen signifikanten Unterschied zu denen der Prästimulationstage bei 23°C RT. Auch die in den zweiten Tageshälften errechneten 1-Std-MW zwi-

schen 85 ± 17 ac und 206 ± 40 ac (Tag 3, Stunden 55-60) bzw. 64 ± 10 ac und 157 ± 24 ac (Tag 4, Stunden 79-84) (Abb. 20) ergaben bei kumulativen 6-Std-MW von 794 ± 144 ac (Tag 3, Stunden 55-60) bzw. 744 ± 100 ac (Tag 4, Stunden 79-84) keinen Unterschied im Vergleich zu entsprechenden Phasen der Versuchstage bei 23°C (Abb. 21).

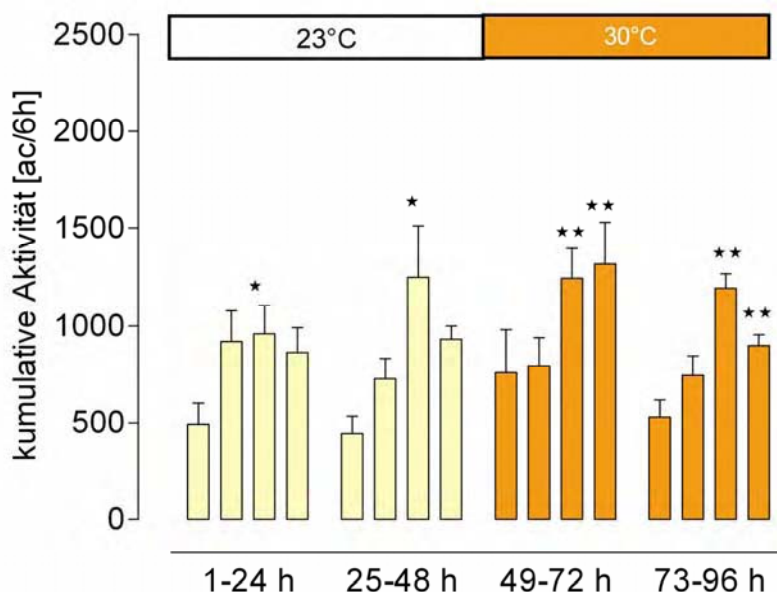


Abb. 21: Darstellung der 6-Std-MW der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe A

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich kumulative 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$) (* $2p \leq 0,05$) ($n=5$).

Während der ersten Nachthälften bei 30°C RT konnten Mittelwerte zwischen 145 ± 19 ac und 322 ± 103 ac (Tag 3, Stunden 61-66) bzw. 125 ± 25 ac und 285 ± 28 ac (Tag 4, Stunden 85-90) ermittelt werden (Abb. 20). Im Vergleich der kumulativen 6-Std-MW von 1245 ± 151 ac (Tag 3, Stunden 61-66) bzw. 1193 ± 74 ac (Tag 4, Stunden 85-90) mit denen der ersten Tageshälften bei 30°C RT zeigte sich ein höher signifikanter Unterschied als bei 23°C RT ($2p \leq 0,01$) (Abb. 21). Dies ergab sich auch für die zweiten Nachthälften der Stimulationstage, deren 1-Std-MW zwischen 120 ± 17 ac und 339 ± 106 ac (Tag 3, Stunden 67-72) bzw. 104 ± 15 ac und 181 ± 17 ac (Tag 4, Stunden 91-96)

96) lagen und deren kumulative 6-Std-MW von 1316 ± 212 ac (Tag 3, Stunden 67-72) bzw. 897 ± 58 ac (Tag 4, Stunden 91-96) signifikante Unterschiede zu den Tagesphasen bei 30°C RT ergaben ($2p \leq 0,01$) (Abb. 21). Ein Vergleich mit den Nachtphasen der Prästimulationstage ergab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.1.1.3. Zeitlicher Verlauf der Trinkwasseraufnahme

Der zeitliche Verlauf der Trinkwasseraufnahme zeigt wie diejenigen der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität eine circadiane Rhythmik, die sich bei thermoneutraler Umgebungstemperatur während der Lichtphase in moderatem, während der Dunkelphase in intensiveren Trinkverhalten äußerte (Abb. 22). Dabei nahm die Trinkwasseraufnahme parallel zur lokomotorischen Aktivität (siehe 3.1.1.2) schon gegen Ende der jeweils zweiten Tagphase zu, die am ersten Versuchstag im Vergleich zur ersten Tagesphase hoch signifikant war ($2p \leq 0,01$). Die gemessenen 1-Std-MW bewegten sich in dieser Zeitspanne am ersten Versuchstag zwischen 0,0 und $3,3 \pm 0,6$ ml bzw. am zweiten Versuchstag zwischen 0 und $3,0 \pm 0,4$ ml. Dies ergab 6-Std-MW von $0,6 \pm 0,2$ ml (Tag 1, Stunden 1-6) und $8,2 \pm 1,5$ ml (Tag 1, Stunden 7-12) bzw. von $2,6 \pm 1,8$ ml (Tag 2, Stunden 25-30) und $6,3 \pm 1,0$ ml (Tag 2, Stunden 31-36) (Abb. 23).

Dem gegenüber stand eine signifikant erhöhte Trinkwasseraufnahme in der ersten und zweiten Nachtphase des ersten Versuchstages bei 23°C RT von $10,9 \pm 1,2$ ml (Tag 1, Stunden 13-18) ($2p \leq 0,01$) und $4,8 \pm 0,9$ ml (Tag 1, Stunden 19-24) ($2p \leq 0,05$), welchen 1-Std-MW zwischen 0,0 und $3,6 \pm 0,8$ ml zugrunde lagen. Dieser tageszeitabhängige Unterschied zeigte sich am zweiten Versuchstag lediglich bei der Trinkwasseraufnahme der ersten Nachtphase, die mit einem 6-Std-MW von $12,5 \pm 3,7$ ml (Tag 2, Stunden 37-42) signifikant gegenüber der ersten Tagphase erhöht war ($2p \leq 0,05$).

Nach 48 Stunden wurde die Raumtemperatur auf 30°C erhöht und der Einfluss auf das Trinkverhalten der Versuchstiere dokumentiert. Bereits in der ersten

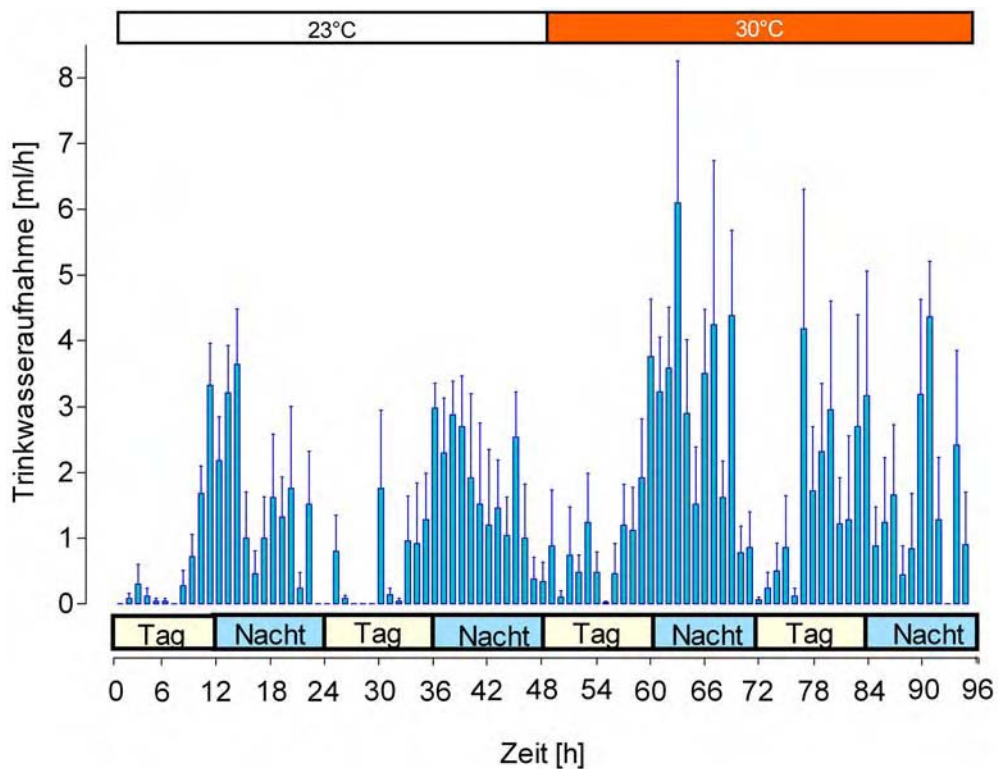


Abb. 22: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Trinkwasseraufnahme der Versuchsgruppe A

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der Trinkwasseraufnahme eines jeden Tieres der Versuchsgruppe A wurden jeweils kumulative 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

Tagesphase des ersten Stimulationstages konnte ein moderater Anstieg der Trinkwasseraufnahme verzeichnet werden (Tag 3, Stunden 49-54) (Abb. 22). Im kumulativen 6-Std-MW ergab sich ein Volumen von $3,9 \pm 1,4$ ml (Tag 3, Stunden 49-54) (Abb. 23). Der moderate Anstieg der Wasseraufnahme ließ sich auch in der zweiten Tageshälfte des ersten Stimulationstages (Tag 3, Stunden 55-60) feststellen. Der kumulative 6-Std-MW für diese Zeitspanne betrug $8,50 \pm 0,6$ ml (Abb. 23). Desweiteren war zu vermerken, dass unter thermischen Stimulationsbedingungen in jeder Stundeneinheit der beiden Tagesphasen Trinkwasser aufgenommen wurde, was bei 23°C RT nicht der Fall war.

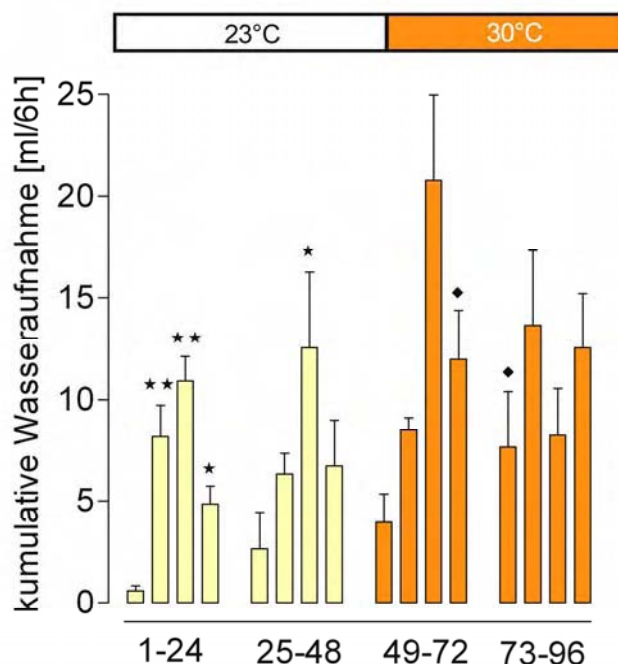


Abb. 23: Darstellung der 6-Std-MW der Trinkwasseraufnahme der Versuchsgruppe A

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich kumulative 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages, Rauten (♦) für den Vergleich zwischen Tag- bzw. Nachtphasen bei 30°C Raumtemperatur (RT) zu jeweils entsprechenden Phasen bei 23°C RT. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$; * $2p \leq 0,05$; ♦ $2p \leq 0,05$) ($n=5$).

In den Nachtphasen des ersten Stimulationstages schwankten die 1-Std-MW zwischen $1,5 \pm 0,9$ und $6,1 \pm 2,2$ ml und ergaben einen 6-Std-MW von $20,8 \pm 4,2$ ml (Tag 3, Stunden 61-66) und $12,0 \pm 2,4$ ml (Tag 3; Stunden 67-72). Die Trinkwasseraufnahme während der zweiten Nachtphase zeigte sich im Vergleich zur entsprechenden Phase bei 23°C RT als signifikant erhöht ($2p \leq 0,05$) (Abb. 23).

Im Verlauf der ersten beiden Tageshälften des zweiten Stimulationstages bei 30°C RT konnte ein weiterer Anstieg der Trinkwasseraufnahme dokumentiert werden, die 1-Std-MW von bis zu $4,2 \pm 2,1$ ml erreichten. Im kumulativen 6-Std-MW wurden Volumina von $7,7 \pm 2,7$ ml (Tag 4, Stunden 73-78) bzw. $13,6 \pm$

3,7 ml (Tag 4, Stunden 79-84) erreicht, welche im Vergleich zu den Werten vergleichbarer Perioden bei 23°C RT des ersten Tages signifikant erhöht waren ($2p \leq 0,05$). In den Nachtphasen des zweiten Stimulationstages bewegten sich die 1-Std-MW zwischen $0,4 \pm 0,4$ und $4,4 \pm 0,8$ ml und ergaben 6-Std-MW von $8,2 \pm 2,3$ ml (Tag 4, Stunden 85-90) bzw. $12,5 \pm 2,7$ ml (Tag 4, Stunden 91-96). Eine ausgeprägte circadiane Rhythmik der Trinkwasseraufnahme war am zweiten Stimulationstage bei 30°C RT nicht mehr nachweisbar (Abb. 22 und 23).

3.1.2. Telemetrie Versuchgruppe B: Hitzestress

3.1.2.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur

Die Aufzeichnung der KT erfolgte wie für Versuchsgruppe A für 96 Stunden, beginnend mit der ersten Lichtphase. Bei der Aufzeichnung der KT-Werte während der ersten 48 Stunden bei 23°C RT konnte die circadiane Rhythmik der KT dokumentiert werden (Abb. 24). Die gemessenen 1-Std-MW der ersten beiden Tageshälften der Prästimulationstage lagen zwischen $37,48 \pm 0,14^\circ\text{C}$ und $37,75 \pm 0,07^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden 1-6) bzw. $37,56 \pm 0,15^\circ\text{C}$ und $37,63 \pm 0,07^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 25-30). Die daraus errechneten 6-Std-MW ergaben $37,55 \pm 0,10^\circ\text{C}$ für Tag 1 (Stunden 1-6) und $37,64 \pm 0,08^\circ\text{C}$ für Tag 2 (Stunden 25-30) (Abb. 25). Die 6-Std-MW der beiden zweiten Tageshälften der Prästimulationstage betrugen $37,79 \pm 0,07^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden 7-12) bzw. $37,76 \pm 0,08^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 31-36) und basierten auf 1-Std-MW zwischen $37,85 \pm 0,13^\circ\text{C}$ und $37,91 \pm 0,07^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden 7-12) bzw. $37,54 \pm 0,18^\circ\text{C}$ und $38,14 \pm 0,15^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 31-36).

In den ersten Hälften der Dunkelphasen der Prästimulationstage bei 23°C RT differierten die gemessenen 1-Std-MW zwischen $38,18 \pm 0,07^\circ\text{C}$ und $38,33 \pm 0,11^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. $38,32 \pm 0,16^\circ\text{C}$ und $38,52 \pm 0,07^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 37-42) (Abb. 24), welche 6-Std-MW von $38,25 \pm 0,10^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. $38,33 \pm 0,04^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 37-42) ergaben, die im Vergleich zu der ersten Tagesphase (Stunden 1-6) signifikant erhöht waren ($2p \leq 0,01$) (Abb. 25). Auch die zweiten Hälften der Nachtphasen bei 23°C RT mit 1-Std-MW zwischen $38,27 \pm 0,24^\circ\text{C}$ und $38,40 \pm 0,17^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden

19-24) bzw. $38,22 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ und $38,62 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ (Tag 2, Stunden 43-48) wiesen 6-Std-MW von $38,29 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ (Tag 1, Stunden 19-24) bzw. $38,37 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ (Tag 2, Stunden 43-48) auf, die im Vergleich zur jeweils ersten Tagphasen signifikant erhöht waren ($2p \leq 0,01$) (Abb. 25).

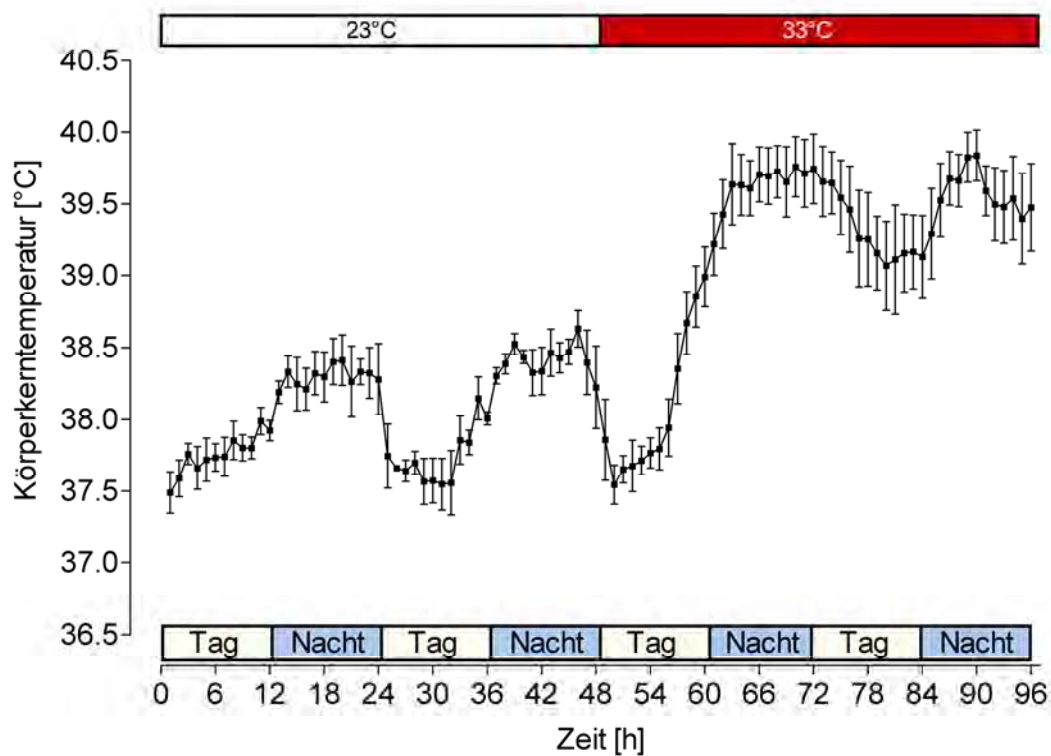


Abb. 24: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe B

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der Körperkerntemperatur eines jeden Tieres der Versuchsgruppe A wurden jeweils arithmetische 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

Nach 48 Stunden wurde die Raumtemperatur auf 33°C angehoben. In den ersten sechs Stunden der Stimulation zeigten sich physiologische 1-Std-MW, die zwischen $37,54 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ und $37,76 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 1-6) schwankten und im 6-Std-MW keine signifikanten Unterschiede zu den Basalwerten der Prästimulationstage bei 23°C RT zeigten (Abb. 24 und 25). Die 1-Std-MW der

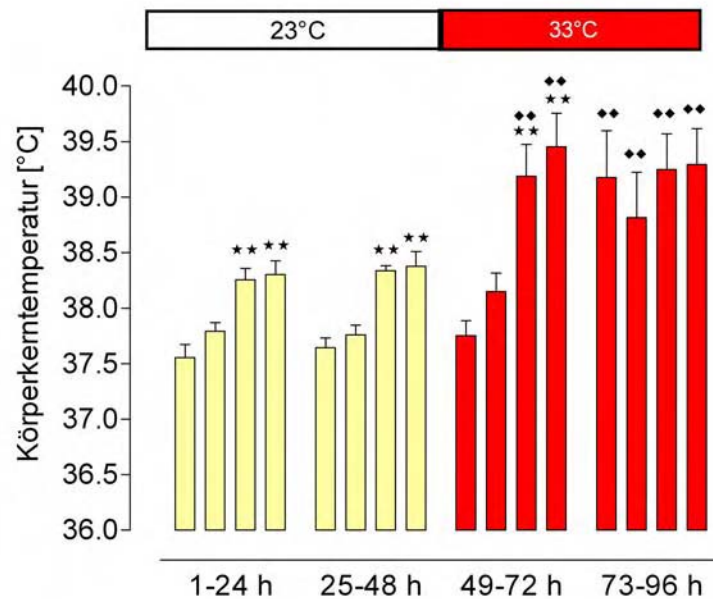


Abb. 25: Darstellung der 6-Std-MW der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe B

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich arithmetische 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages, Rauten (♦) für den Vergleich zwischen Tag- bzw. Nachtphasen bei 33°C Raumtemperatur (RT) zu jeweils entsprechenden Phasen bei 23°C RT. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (**,♦♦ 2p ≤ 0,01) (n=5).

zweiten Tageshälfte von Versuchstag 3 hingegen wiesen Körperkerntemperaturen zwischen $37,79 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ und $38,89 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ auf (Tag 3, Stunden 7-12), die im 6-Std-MW von $38,14 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zur Prästimulation zwar moderat erhöht, jedoch nicht signifikant unterschiedlich war. Anders verhielt es sich bei den ermittelten Werten der ersten Hälfte der Dunkelphase. Bei deutlich erhöhten KT von $39,21 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ bis $39,7 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$ für die 1-Std-MW (Tag 3, Stunden 61-66) (Abb. 24) zeigte der daraus resultierende 6-Std-MW von $39,18 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ eine signifikante Erhöhung sowohl im Vergleich zur Tagesphase der Stimulation als auch im Bezug zur vergleichbaren Dunkelperiode während der Prästimulationsphase bei 23°C RT (2p ≤ 0,01) (Abb. 25). Dasselbe war der Fall für die zweite Nachphase (Tag 3, Stunden 67-72) mit einem 6-Std-MW von $39,47 \pm 0,26^{\circ}\text{C}$.

Der deutlichste Einfluss der Erhöhung der Raumtemperatur auf 33°C ließ sich am Versuchstag 4 festhalten. Sowohl die erste als auch die zweite Hälfte der Lichtphase wiesen markant erhöhte Körperkerntemperaturen mit 1-Std-MW zwischen $39,24 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$ und $39,64 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 73-78) bzw. $39,06 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$ und $39,12 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 79-84) auf. Die daraus ermittelten 6-Std-MW von $39,17 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$ bzw. $38,81 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ waren im Vergleich zur jeweils entsprechenden Phase bei 23°C RT hoch signifikant erhöht ($2p \leq 0,01$) (Abb. 24 und 25). Bei 1-Std-MW der ersten und zweiten Nachthälfte zwischen $39,28 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$ und $39,83 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 85-90) bzw. $39,39 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$ und $39,58 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ (Tag 4, Stunden 91-96) ergaben sich 6-Std-MW von $39,24 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$ bzw. $39,25 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$, die im Vergleich zu den beiden Tageshälften keinen signifikanten Unterschied mehr aufwiesen, jedoch im direkten Vergleich zur entsprechenden Tagesperiode bei 23°C RT signifikant erhöht waren ($2p \leq 0,01$). Der Verlauf der circadianen Rhythmik der KT ergab sich zwar noch in der Darstellung fortlaufender 1-Std-MW (Abb. 24), nicht mehr jedoch aus dem statistischen Vergleich der 6-Std-MW für Tag 4 bei 33°C RT (Abb. 25).

3.1.2.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität

Während der gesamten Aufzeichnungsdauer der lokomotorischen Aktivität von 96 Stunden (2 Tage bei 23°C, 2 Tage bei 33°C RT) konnte die circadiane Rhythmik dieses Parameters dargestellt werden (Abb. 26). Während der ersten Tagphase (Stunden 1-6) der Prästimulationsperiode bei 23°C RT schwankten die 1-Std-MW zwischen 52 ± 21 ac und 156 ± 30 ac (Tag 1, Stunden 1-6) bzw. 14 ± 4 ac und 159 ± 52 ac (Tag 2, Stunden 25-30) (Abb. 26). Die kumulativen 6-Std-MW lagen bei 687 ± 144 ac respektive 320 ± 89 ac (Abb. 27). Die 1-Std-MW für die telemetrisch aufgezeichnete lokomotorische Aktivität der zweiten Tageshälften bei 23°C RT beliefen sich auf 22 ± 8 ac bis 120 ± 36 ac (Tag 1, Stunden 7-12) sowie 49 ± 26 ac bis 98 ± 35 ac (Tag 2, Stunden 31-36); die kumulativen 6-Std-MW errechneten sich für die gesamte Gruppe von fünf Tieren zu 449 ± 96 ac bzw. 532 ± 103 ac für die entsprechenden Tagesphasen (Abb. 27).

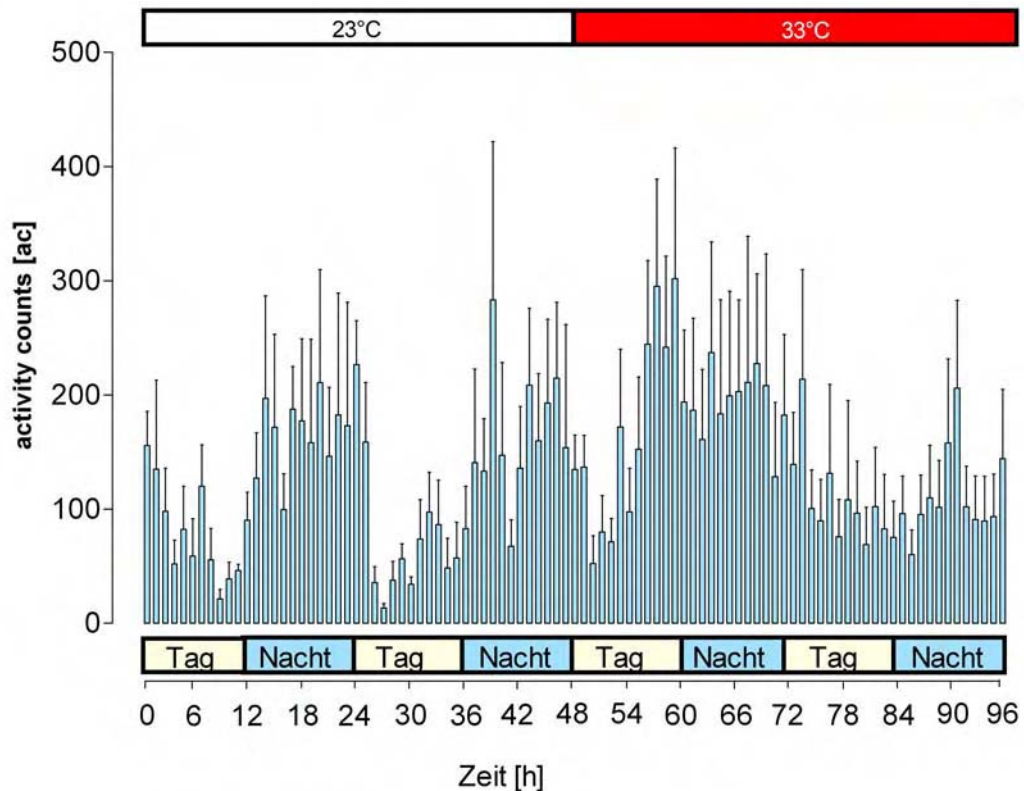


Abb.26: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe B

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der lokomotorischen Aktivität eines jeden Tieres der Versuchsgruppe B wurden jeweils kumulative 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

Während der ersten sechs Stunden der Dunkelphasen von Tag 1 und 2 bei 23°C RT konnten mittlere Aktivitäten von 100 ± 32 ac bis 197 ± 90 ac (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. von 68 ± 23 ac bis 283 ± 139 ac (Tag 2, Stunden 37-41) gemessen werden (Abb. 26). Die kumulativen 6-Std-MW von 1234 ± 248 ac und 1208 ± 344 ac spiegelten durch ihren signifikanten Unterschied ($2p \leq 0,01$) zur jeweils ersten Tagesphase die circadiane Rhythmik der lokomotorischen Aktivität wider (Abb. 27). Auch die ermittelte Aktivität (1-Std-MW) der zweiten Nachtphasen von Tag 1 und 2 differierten zwischen mittleren Aktivitäten von 147 ± 60 ac bis 227 ± 39 ac (Tag 1, Stunden 19-24) bzw. von 135 ± 30 ac bis 215 ± 66 ac (Tag 2, Stunden 43-48), wodurch sich kumulative 6-Std-MW von 1379 ± 490 ac bzw. 1338 ± 160 ac errechneten, die ebenfalls im Bezug auf die erste Tagesphase eine signifikante Zunahme aufwiesen ($2p \leq 0,01$) (Abb. 27).

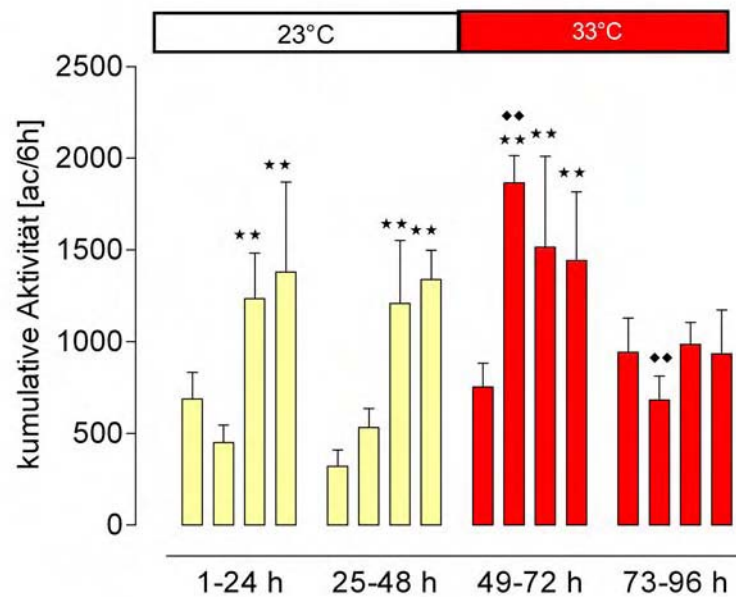


Abb. 27: Darstellung des 6-Std-MW der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe B

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich kumulative 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages, Rauten (♦) für den Vergleich zwischen Tag- bzw. Nachtphasen bei 33°C Raumtemperatur (RT) zu jeweils entsprechenden Phasen bei 23°C RT. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (**, ♦♦ 2p ≤ 0,01) (n=5).

Nach der 48-stündigen Phase bei 23°C RT wurde die Raumtemperatur auf 33,0°C erhöht. Die erste Tagphase (Tag 3, Stunden 49-54) zeigte mit 1-Std-MW zwischen 53 ± 24 ac und 172 ± 68 ac und einem kumulativen 6-Std-MW von 752 ± 131 ac keinen Einfluss der Umgebungstemperatur auf die lokomotorische Aktivität. Deutlich erhöhte sich die lokomotorische Aktivität jedoch innerhalb der zweiten Tagesphase (Tag 3, Stunden 55-60) (Abb. 26 und 27). Mit 1-Std-MW zwischen 153 ± 63 ac und 302 ± 114 ac erreichte der kumulative 6-Std-MW mit 1864 ± 149 ac einen hoch signifikanten Unterschied sowohl im Vergleich mit der ersten Tageshälfte des ersten Stimulationstages (Tag 3, Stunden 49-54), als auch mit den gemessenen Werten der vergleichbaren Tagesphase bei 23°C RT (2p ≤ 0,01). Bereits sechs Stunden nach Erhöhung der Umgebungstemperatur war somit die circadiane Rhythmik der lokomotorischen Aktivität aufgehoben.

In den beiden Nachtperioden des ersten Stimulationstages erreichten die 1-Std-MW für die lokomotorische Aktivität 161 ± 61 ac bis 237 ± 97 ac (Tag 3, Stunden, 61-66) bzw. 128 ± 66 ac bis 228 ± 79 ac (Tag 3, Stunden 67-72). Die darauf basierenden kumulativen 6-Std-MW von 1514 ± 496 ac und 1442 ± 375 ac zeigten im Vergleich zur ersten Tagphase (Tag 3, Stunden 49-54) einen signifikanten Unterschied ($2p \leq 0,01$). Im direkten Vergleich mit den bei 23°C RT erhobenen Werten für die gleiche Lichtperiode bei 23°C konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abb. 27).

Am zweiten Tag der thermischen Stimulation bewegten sich die gemessenen 1-Std-MW für beide Tagesphasen zwischen 76 ± 33 ac und 132 ± 78 ac (Tag 4, Stunden 73-78) bzw. zwischen 69 ± 33 ac und 102 ± 52 ac (Tag 4, Stunden 79-84) (Abb. 26). Die kumulativen 6-Std-MW erreichten 942 ± 186 ac bzw. 681 ± 130 ac, wobei letzterer im Vergleich mit den zeitgleichen Wert bei 23°C signifikant ($2p \leq 0,05$) erhöht war (Abb. 27). Während der Nachtphasen des zweiten Stimulationstages zeigte sich eine moderate Reduktion der lokomotorischen Aktivität. Bei 1-Std-MW von 60 ± 22 ac bis 206 ± 77 ac (Tag 4, Stunden 85-90) bzw. von 90 ± 39 ac bis 182 ± 97 ac (Tag 4, Stunden 91-96) (Abb. 27) wiesen die daraus resultierenden, kumulativen 6-Std-MW von 934 ± 38 ac und 985 ± 119 ac weder einen signifikanten Unterschied zur ersten Tagphase des gleichen Tages noch zu den Nachtphasen unter Kontrollbedingungen bei 23°C RT auf (Abb. 26 und 27). Auch am zweiten Tag der thermischen Stimulation schien die circadiane Rhythmik der lokomotorischen Aktivität aufgehoben.

3.1.2.3. Zeitlicher Verlauf der Trinkwasseraufnahme

Die Aufzeichnung der Trinkwasseraufnahme erfolgte über die gesamte Versuchsdauer von 96 Stunden mit Beginn der ersten Lichtphase. Während der ersten beiden Tage bei 23°C RT konnte wie auch in der Versuchsgruppe A ein circadianer Rhythmus des Trinkverhaltens dokumentiert werden (Abb. 28). Die pro Stunde aufgenommenen Trinkwassermengen betrugen zwischen $0,2 \pm 0,1$ und $2,0 \pm 0,5$ ml (Tag 1, Stunden 1-6) bzw. $0,1 \pm 0,1$ und $0,9 \pm 0,5$ ml (Tag 1, Stunden 7-12), während in den beiden Nachtphasen 1-Std-MW zwischen

1,8 ± 0,3 und 2,3 ± 20,7 ml (Tag 1 Stunden 13-18) bzw. 1,4 ± 0,5 und 3,5 ± 1,2 ml (Tag 1, Stunden 19-24) erreicht wurden (Abb. 28). Deutlicher ist die circadiane Rhythmik anhand der kumulation 6-Std-MW erkennbar. Während innerhalb der beiden Tagesphasen Trinkwassermengen von 8,0 ± 0,3 ml (Tag 1, Stunden 1-6) und 3,4 ± 1,2 ml verzeichnet werden konnten, betrugen die in den Nachtphasen ermittelten Volumina 12,4 ± 0,6 ml (Tag 1, Stunden 13-18) und 12,0 ± 1,9 ml (Tag 1, Stunden 19-24). Im statistischen Vergleich zur ersten Tagesphase erwies sich die Trinkwasseraufnahme der ersten Nachtphase als signifikant ($2p \leq 0,05$) erhöht (Abb. 29).

Der zweite Versuchstag bei 23°C RT zeigte einen ähnlichen Verlauf der Trinkwasseraufnahme. In den ersten Tagesphasen schwankten die ermittelten 1-Std-MW zwischen 0,0 und 0,1 ± 0,1 ml (Tag 2, Stunden 25-30) bzw. 0,0 und 1,0 ± 0,6 ml (Tag 2, Stunden 31-36) (Abb. 28). Diese ergaben 6-Std-MW von 0,1 ± 0,1 ml (Tag 2, Stunden 25-30) und 2,6 ± 0,7 ml (Abb. 29). In den beiden Nachtphasen des zweiten Versuchstages berechneten sich die aufgenommenen Trinkwassermengen auf 1-Std-MW von 0,7 ± 0,2 bis 2,9 ± 1,2 ml (Tag 2, Stunden 37-42) bzw. 0,1 ± 0,1 bis 1,6 ± 0,6 ml (Tag 2, Stunden 43-48). Die daraus ermittelten 6-Std-MW von 11,9 ± 0,9 ml (Tag 2, Stunden 37-42) und 4,7 ± 0,4 ml (Tag 2, Stunden 43-48) erwiesen sich wie auch die Trinkwassermengen der zweiten Tagesphase im statistischen Vergleich mit der ersten Tagesphase als signifikant erhöht ($2p \leq 0,05$) (Abb. 29).

Nach Erhöhung der RT auf 33°C konnte am Ende der zweiten Tagesphase ein leichter Anstieg der Trinkwasseraufnahme verzeichnet werden. Die gemessenen 1-Std-MW betrugen zwischen 0,0 und 2,8 ± 0,7 ml (Tag 3, Stunden 49-54) bzw. 0,0 und 2,0 ± 0,3 ml (Tag 3, Stunden 55-60) und ergaben somit kumulative 6-Std-MW von 3,6 ± 0,7 ml (Tag 3, Stunden 49-54) und 5,8 ± 0,7 ml (Tag 3, Stunden 55-60) (Abb. 29). Im statistischen Vergleich mit entsprechenden Tagesphasen des ersten Versuchstages erwies sich die aufgenommene Trinkwassermenge der ersten Tagesphase bei 33°C sogar als signifikant erniedrigt ($2p \leq 0,05$). In den beiden Nachtphasen des dritten Versuchstages errechneten sich die 1-Std-MW als 1,4 ± 0,3 und 2,8 ± 0,9 ml (Tag 3, Stunden 61-66) bzw.

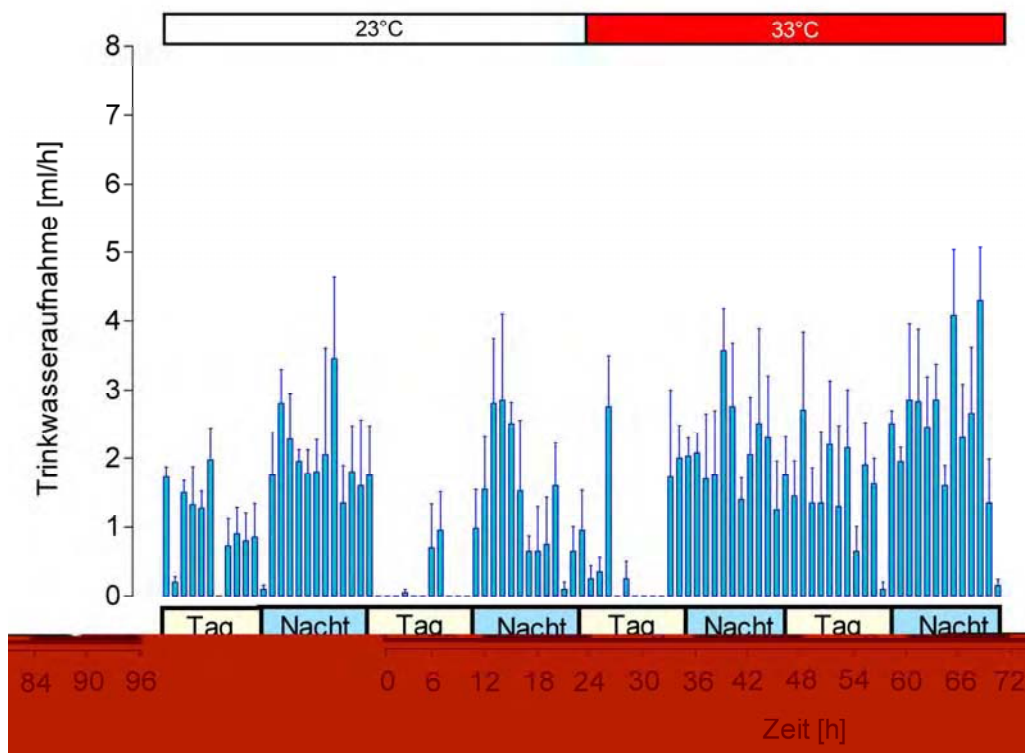


Abb. 28: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Wasseraufnahme der Versuchsgruppe B

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der Trinkwasseraufnahme eines jeden Tieres der Versuchsgruppe B wurden jeweils kumulative 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

$1,3 \pm 0,7$ und $2,5 \pm 1,4$ ml (Tag 3, Stunden 67-72) (Abb. 28). Die 6-Std-MW von $13,3 \pm 1,5$ ml (Tag 3, Stunden 61-66) und $11,3 \pm 1,4$ ml (Tag 3, Stunden 67-72) zeigten lediglich im Vergleich mit der ersten Tagesphase des dritten Versuchstages eine signifikante Erhöhung der Trinkwasseraufnahme ($2p \leq 0,05$). Ein statistisch signifikant gesteigertes Trinkverhalten im direkten Vergleich mit der jeweiligen Nachtphase bei 23°C konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 29).

Am vierten Versuchstag konnte ein weiterer Anstieg der Trinkwasseraufnahme vor allem während der Tages-, teilweise auch der Nachtphasen demonstriert werden (Abb. 28 und 29). Die 1-Std-MW stiegen auf Werte zwischen $1,3 \pm 1,2$ ml und $2,7 \pm 1,1$ ml (Tag 4, Stunden 72-78) bzw. $0,1 \pm 0,1$ ml und $2,5 \pm 0,2$ ml (Tag 4, Stunden 79-84) an und ergaben 6-Std-MW von $11,1 \pm 3,4$ ml bzw.

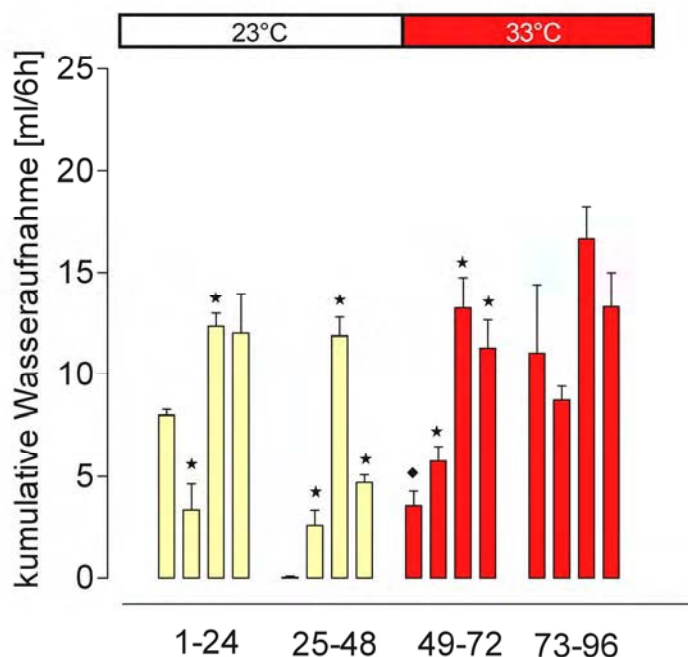


Abb. 29: Darstellung des 6-Std-MW der Trinkwasseraufnahme der Versuchsgruppe B

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich kumulative 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages, Rauten (♦) für den Vergleich zwischen Tag- bzw. Nachtphasen bei 30°C Raumtemperatur (RT) zu jeweils entsprechenden Phasen bei 23°C RT. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (* $2p \leq 0,05$; ♦ $2p \leq 0,05$) (n=5).

$8,7 \pm 0,7$ ml (Abb. 29). Aufgrund dieses Anstieges der Trinkwasseraufnahme während der Lichtphase konnte kein signifikanter Unterschied zur Trinkwasseraufnahme während der Dunkelfase nachgewiesen werden. Die 1-Std-MW der beiden Nachtphasen bewegten sich zwischen $1,6 \pm 0,3$ und $4,1 \pm 1,0$ ml (Tag 4, Stunden 85-90) bzw. $0,2 \pm 0,1$ und $4,3 \pm 0,8$ ml (Tag 4, Stunden 91-96). Die daraus resultierenden 6-Std-MW betrugen $16,7 \pm 1,6$ ml und $13,3 \pm 1,7$ ml (Abb. 29). Ein signifikanter Anstieg der Trinkwasseraufnahme im Vergleich zu entsprechenden Nachtphasen bei 23°C RT konnte nicht nachgewiesen werden. Die circadiane Rhythmik war am zweiten Versuchstag bei 33°C RT nur noch marginal zu erkennen (Abb. 28 und 29).

3.1.3. Telemetrie Versuchsgruppe C: Isotone Hypovolämie

3.1.3.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur

In dieser Versuchsgruppe wurde durch die systemische Applikation von PEG eine isotone, intravasale Hypovolämie erzeugt. Die Aufzeichnungsdauer der KT betrug bei der Versuchsgruppe C insgesamt 56 Stunden. Wie bereits anhand der Daten von Versuchsgruppe A und B demonstriert, zeigte sich auch bei der Versuchsgruppe C eine circadiane Rhythmik des Körperkerntemperaturverlaufs bei einer Umgebungstemperatur von 23°C (Abb. 30). Vor der experimentellen Induktion der emessenen Temperaturwerte im Bereich der unter 3.1.1 und 3.1.2. dargestellten Befunde (Tag 1 und 2, Stunden 1-48). Nach i.p. Injektion des körperwarmen PEG konnte keine signifikante Änderung der Körperkerntemperatur im Vergleich zu den Werten der Tage 1 und 2 wäh-

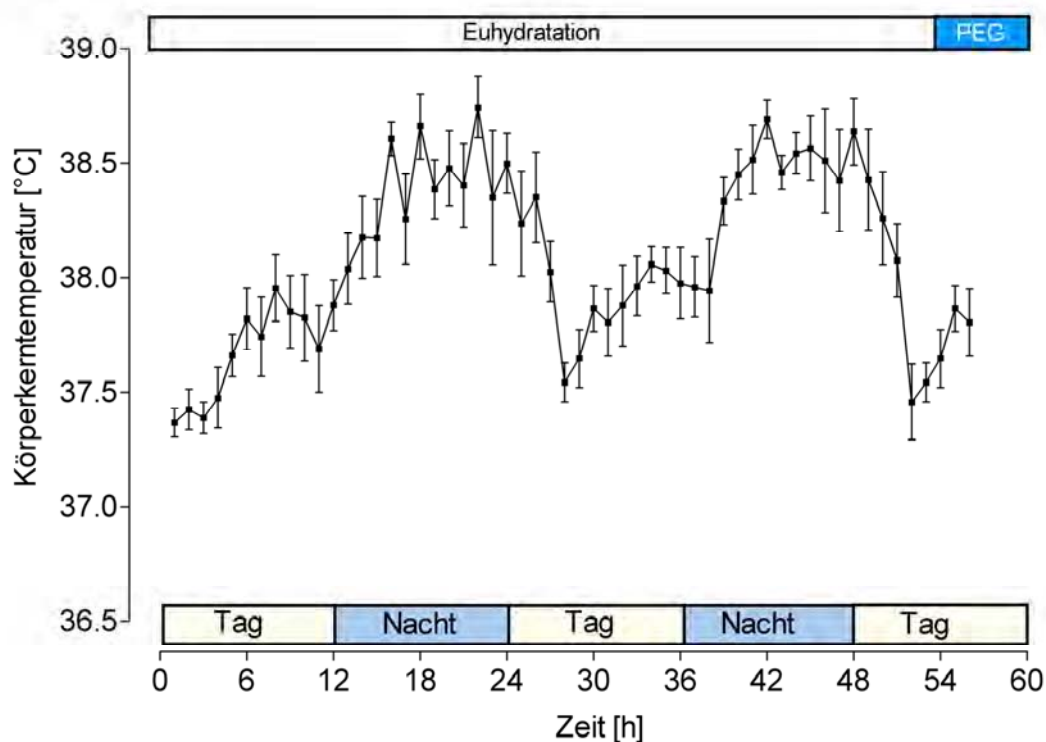


Abb. 30: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe C

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der Körperkerntemperatur eines jeden Tieres der Versuchsgruppe C wurden jeweils arithmetische 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe (n=5) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

rend der ersten Lichtphase dokumentiert werden (Abb. 30 und 31). Die mittlere KT nach Applikation von PEG betrug $37,9 \pm 0,11^\circ\text{C}$ (Tag 3, Stunden 49-52).

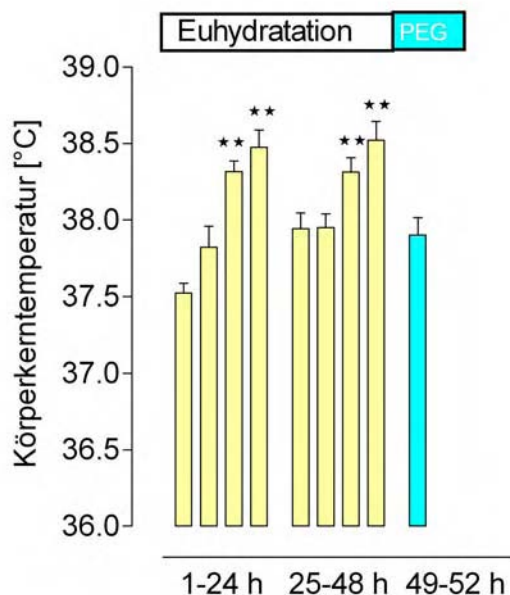


Abb. 31: Darstellung der 6-Std-MW der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe C

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich arithmetische 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$). (n=5).

3.1.3.2. Zeitlicher Verlauf der lokomotorischen Aktivität

Auch für den zeitlichen Verlauf der lokomotorischen Aktivität bei 23°C RT konnte - wie bereits bei den Versuchsgruppen A und B dargestellt - eine circadiane Rhythmik mit gesteigerter Laufaktivität während der Dunkelphasen nachgewiesen werden (Abb. 32). Die errechneten 6-Std-MW der beiden Tagesphasen des ersten Versuchstages betrugen 509 ± 85 ac (Tag 1, Stunden 1-6) bzw. 1022 ± 205 ac (Tag 1, Stunden 7-12) (Abb. 33). Während der aktiveren Nachtphasen konnten 1812 ± 88 ac (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. 1327 ± 95 ac (Tag 1, Stunden 19-24) als 6-Std-MW telemetrisch für die Ratten registriert

werden, die sich im direkten Vergleich mit den 6-Std-MW der ersten Tagphase als hoch signifikant stimuliert zeigten ($2p \leq 0,01$) (Abb. 33).

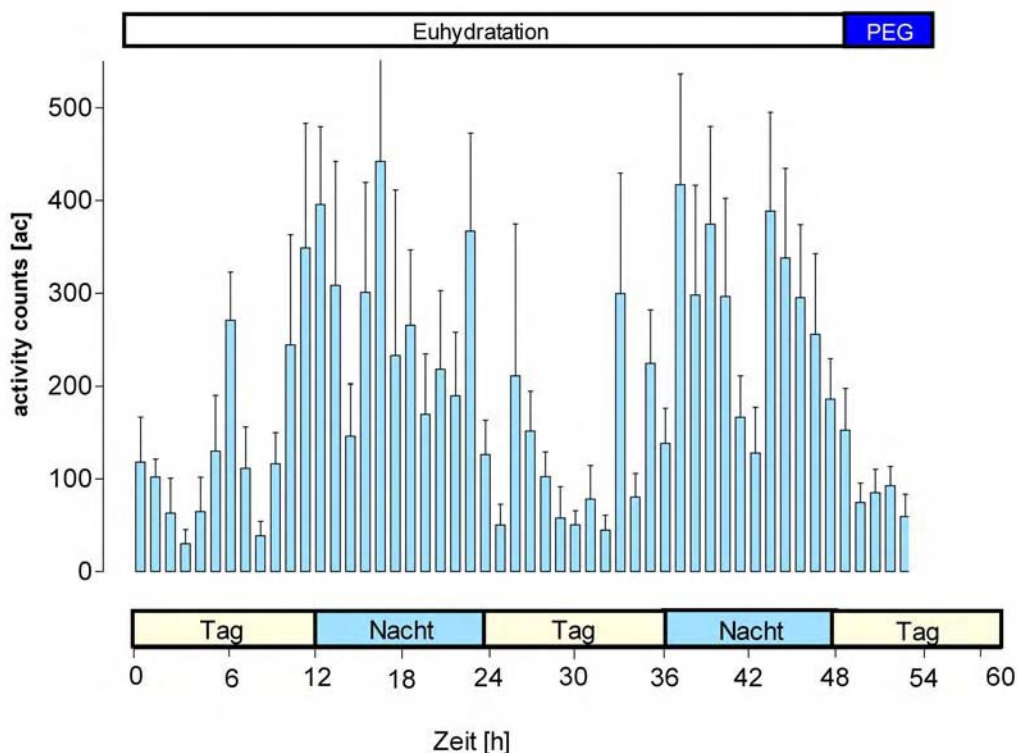


Abb. 32: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe C

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der lokomotorischen Aktivität eines jeden Tieres der Versuchsgruppe C wurden jeweils kumulative 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

Am zweiten Versuchstag betrugen die 6-Std-MW der ersten Tagesphasen 624 ± 246 ac (Tag 2, Stunden 25-30) und 871 ± 128 ac (Tag 2, Stunden 31-36). Während der beiden Nachtphasen des zweiten Versuchstages konnten 6-Std-MW von 1674 ± 274 ac (Tag 2, Stunden 37-42) und 1627 ± 151 ac (Tag 2, Stunden 43-48) verzeichnet werden. Im statistischen Vergleich mit der ersten Tagesphase zeichneten sich beide Nachtphasen durch eine signifikant gesteigerte lokomotorische Aktivität der Versuchstiere aus ($2p \leq 0,01$) (Abb. 32 und 33). In den Stunden unmittelbar nach Applikation des PEG konnte bei einem extrapoliert errechneten 6-Std-MW von 304 ± 56 ac (Tag 3, Stunden 49-

54) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der entsprechenden Tagesphase bei Euhydratation festgehalten werden (Abb. 33).

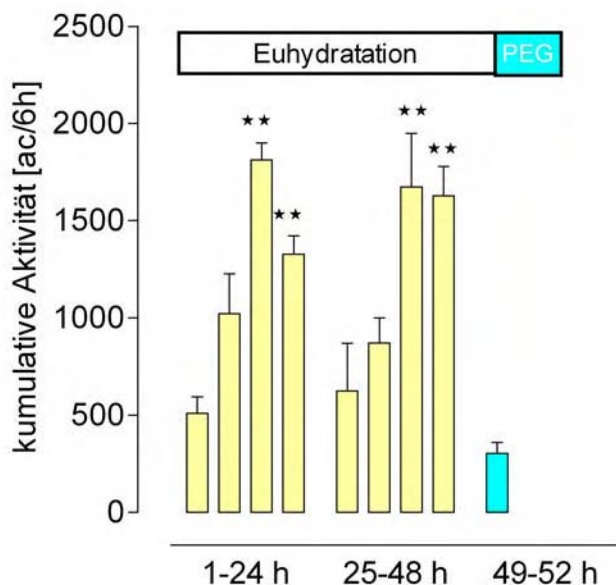


Abb. 33: Darstellung der 6-Std-MW für die lokomotorische Aktivität der Versuchsgruppe C

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden für den statistischen Vergleich kumulative 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$) ($n=5$).

3.1.4. Telemetrie Versuchsgruppe D: Osmotische Stimulation

3.1.4.1. Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur

Die Aufzeichnung der KT erfolgte bei der Versuchsgruppe D über 72 Stunden. Innerhalb der ersten 48 Stunden, in denen Trinkwasser *ad libitum* gewährt wurde, zeigte sich die typische circadiane Rhythmik im zeitlichen Verlauf der KT (Abb. 34). In der ersten Tageshälfte (Tag 1, Stunden 1-6) ergab sich ein 6-Std-MW der KT von $37,42 \pm 0,03^\circ\text{C}$, in der zweiten Tageshälfte (Tag 1, Stunden 7-12) von $37,67 \pm 0,01^\circ\text{C}$, welche auf 1-Std-MW von $37,26 \pm 0,06^\circ\text{C}$ bis $37,52 \pm 0,03^\circ\text{C}$ (Tag 1 Stunden 1-6) bzw. von $37,48 \pm 0,03^\circ\text{C}$ bis $37,91 \pm 0,03^\circ\text{C}$ (Tag 1, Stunden 7-12) beruhten. In den beiden Nachtphasen konnten 1-Std-MW von

38,01 ± 0,08°C bis 38,51 ± 0,13°C (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. von 37,57 ± 0,06°C bis 38,25 ± 0,07°C (Tag 1, Stunden 19-24) ermittelt werden, welche sowohl in der ersten als auch in der zweiten Nachthälfte zu einer signifikanten Erhöhung der 6-Std-MW auf 38,24 ± 0,04°C (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. 38,03 ± 0,05°C (Tag 1, Stunden 19-24) führten ($2p \leq 0,01$) (Abb. 35).

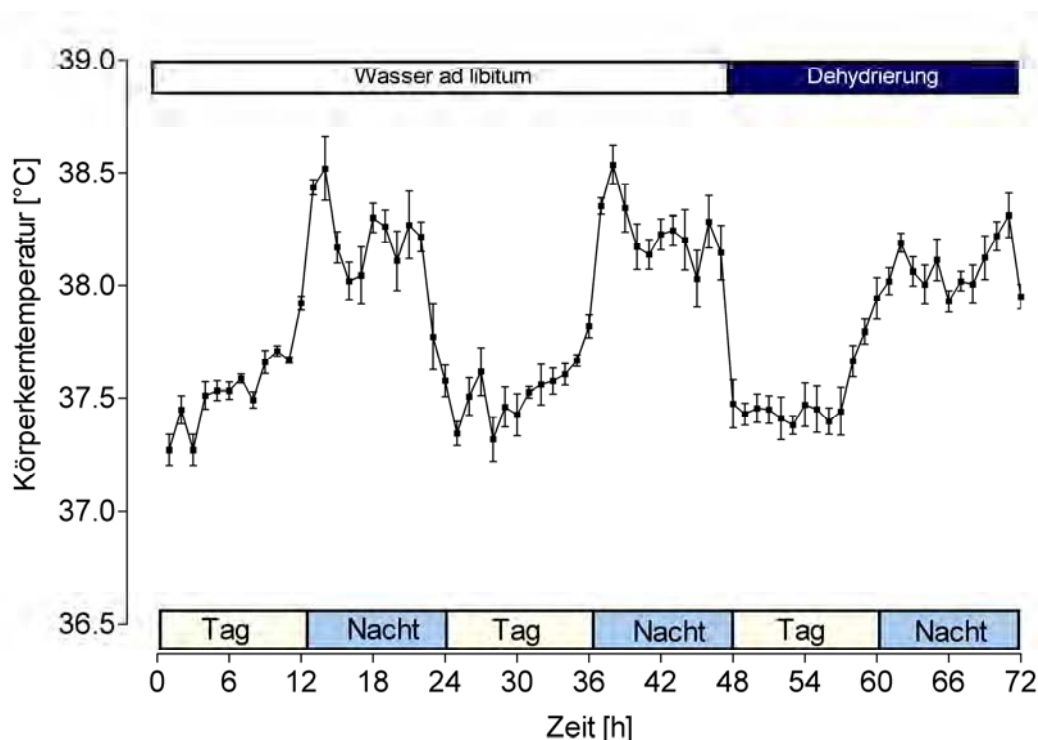


Abb. 34 Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe D

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der Körperkerntemperatur eines jeden Tieres der Versuchsgruppe D wurden jeweils arithmetische 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

In den beiden Tagesphasen des zweiten Versuchstages betrugen die 6-Std-MW 37,4 ± 0,06°C (Tag 2, Stunden 25-30) bzw. 37,62 ± 0,04°C (Tag 2, Stunden 31-36) und beruhten auf 1-Std-MW von 37,31 ± 0,09°C bis 37,61 ± 0,10°C (Tag 2, Stunden 25-30) bzw. von 37,55 ± 0,09°C bis 37,81 ± 0,04°C (Tag 2, Stunden 31-36) (Abb. 34 und 35). Dem gegenüber erreichten die 1-Std-MW der beiden Nachtphasen 1-Std-MW von 38,13 ± 0,06°C bis 38,53 ± 0,08°C (Tag 2, Stunden 37-42) bzw. von 37,47 ± 0,10°C bis 38,27 ± 0,10°C (Tag 2, Stunden

43-48). Diese ergaben 6-Std-MW von $38,29 \pm 0,03^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 37-42) bzw. $38,06 \pm 0,04^\circ\text{C}$ (Tag 2, Stunden 43-48), die im statistischen Vergleich zur ersten Tagphase desselben Versuchstages (Tag 2, Stunden 25-30) signifikant erhöht waren ($2p \leq 0,01$) (Abb. 35).

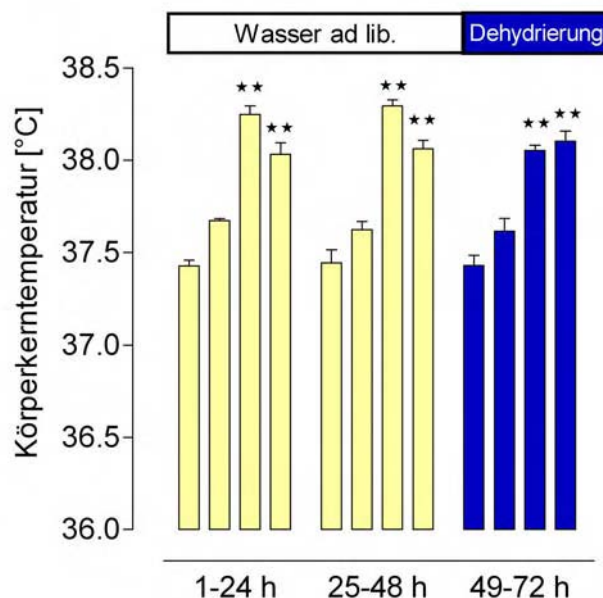


Abb. 35: Darstellung der 6-Std-MW der Körperkerntemperatur der Versuchsgruppe D

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich arithmetische 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (**, $2p \leq 0,01$) ($n=5$).

Während der 24-stündigen Dehydrierung blieben der circadiane Rhythmus der KT und der signifikante Unterschied zwischen den Hell- und Dunkelphasen erhalten. Die 6-Std-MW der KT zeigten keine signifikante Erhöhung und lagen sowohl in den beiden Tages- als auch Nachthälften im Bereich des physiologischen Referenzbereichs (Abb. 34 und 35). Im Laufe der ersten Tagephase des dritten Versuchstages bewegten sich die 1-Std-MW der Körperkerntemperatur zwischen $37,37 \pm 0,04^\circ\text{C}$ und $37,46 \pm 0,09^\circ\text{C}$ (Tag 3, Stunden 49-54), während in der zweiten Tagesphase 1-Std-MW zwischen $37,39 \pm 0,05^\circ\text{C}$ und $37,39 \pm 0,09^\circ\text{C}$ (Tag 3, Stunden 55-60) gemessen werden konnten. Dies ergab 6-Std-

MW von $37,43 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 49-54) bzw. $37,61 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ (Tag 3, Stunden 55-60). Auch in den beiden Nachtphasen des dritten Versuchstages zeigten sich bei den 1-Std-MW der Körperkerntemperatur keine Abweichungen vom Referenzbereich bei 23°C RT mit Zugang zu Trinkwasser. In der ersten Nachtphase ergaben sich 1-Std-MW zwischen $37,92 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ und $38,18 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$, welche in einem 6-Std-MW von $38,05 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$ resultierten (Tag 3, Stunden 61-66). Auch in der zweiten Nachthälfte ergaben sich 1-Std-MW der Körperkerntemperatur von $37,99 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ bis $38,30 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$, welche einem 6-Std-MW von $38,10 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ entsprachen (Tag 3 Stunden 67-72). Der statistische Vergleich der 6-Std-MW sowohl der beiden Tages-, als auch Nachtphasen mit den entsprechenden Phasen des ersten Versuchstages im Zustand der Euhydration zeigt, dass sich die KT im Zustand der Dehydrierung nicht signifikant veränderte.

3.1.4.2. Verlauf der lokomotorischen Aktivität

Die Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität erfolgte über die gesamte Versuchsdauer von 72 Stunden. Für die lokomotorischen Aktivität konnte wie für den Verlauf der KT eine ausgeprägte circadiane Rhythmik demonstriert werden, deren zeitlicher Verlauf als Stundenmittelwert dargestellt wurde (Abb. 36). In den ersten sechs Stunden des ersten Versuchstages zeigten sich 1-Std-MW der lokomotorischen Aktivität zwischen 77 ± 28 ac und 122 ± 14 ac, welches einem kumulativen 6-Std-MW von 602 ± 75 ac (Tag 1, Stunden 1-6) entsprach. In der zweiten Tageshälfte konnten 1-Std-MW zwischen 85 ± 9 ac und 212 ± 8 ac aufgezeichnet werden (Abb. 36) und ergaben einen 6-Std-MW von 748 ± 72 ac (Tag 1, Stunden 7-12) (Abb. 37). In den beiden Nachtphasen des ersten Versuchstages erhöhte sich die gemessene Aktivität signifikant auf 6-Std-MW von 1129 ± 74 ac (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. 1066 ± 103 ac ($2p \leq 0,01$) (Tag 1, Stunden 19-24), welche auf 1-Std-MW von 130 ± 23 ac bis 251 ± 32 ac (Tag 1, Stunden 13-18) bzw. von 132 ± 33 ac bis 203 ± 35 ac (Tag 1, Stunden 19-24) basierten. Am zweiten Versuchstag betrugen die ermittelten 6-Std-MW der lokomotorischen Aktivität in der ersten Tageshälfte 608 ± 29 ac (Tag 2, Stunden 25-30) und in der zweiten Tageshälfte 804 ± 145 ac (Tag 2, Stunden 31-36), welchen 1-Std-MW von 66 ± 17 ac bis 162 ± 31 ac (Tag 2, Stunden 25-30) bzw.

von 73 ± 13 ac bis 175 ± 25 ac (Tag 2, Stunden 31-36) zugrunde lagen. Die in den beiden Nachthälften ermittelten 1-Std-MW bewegten sich zwischen 141 ± 37 ac und 244 ± 23 ac (Tag 2, Stunden 37-42) bzw. zwischen 156 ± 23 ac und 238 ± 26 ac (Tag 2, Stunden 43-48) (Abb. 36). Die daraus resultie-

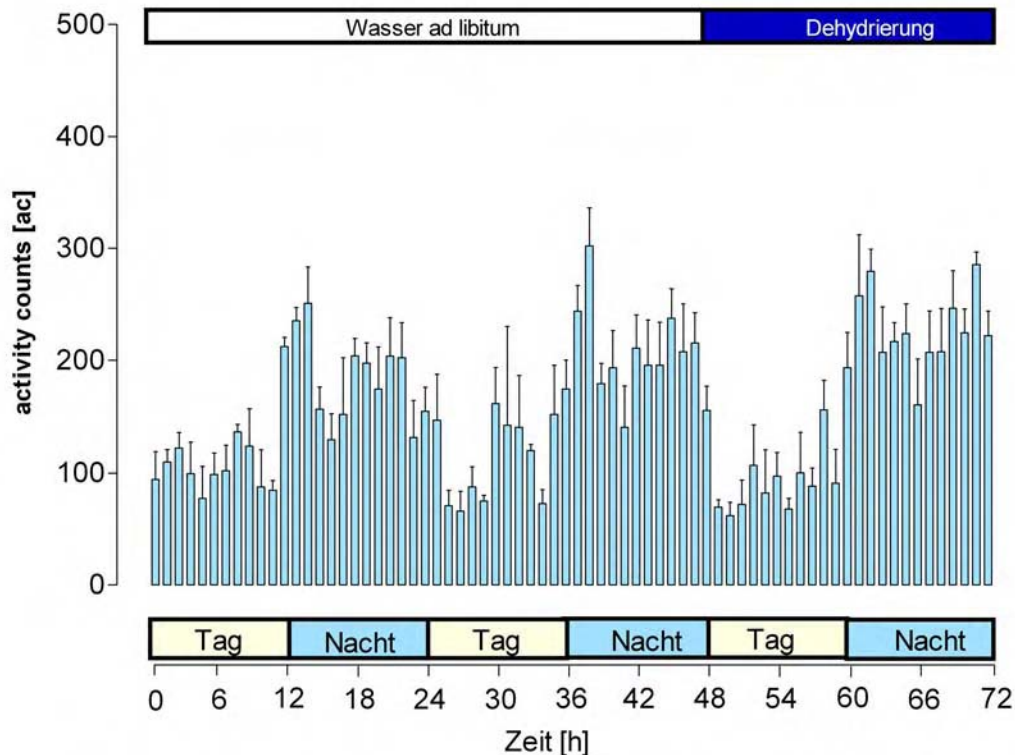


Abb. 36: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe D.

Aus den telemetrisch erhobenen 5-min Mittelwerten der lokomotorischen Aktivität eines jeden Tieres der Versuchsgruppe C wurden jeweils kumulative 1-Std-MW gebildet. Aus diesen wurden die 1-Std-MW für die gesamte Gruppe ($n=5$) bestimmt und mit dem jeweiligen mittleren Standardfehler (SEM) gegen die Zeit aufgetragen.

renden 6-Std-MW von 1271 ± 68 ac (Tag 2, Stunden 37-52) bzw. 1208 ± 89 ac (Tag 2, Stunden 53-58) waren im Vergleich zur ersten Tagesphase desselben Versuchstages signifikant erhöht ($2p \leq 0,01$).

Nach Entzug des Trinkwassers für 24 Stunden konnten keine signifikanten Änderungen in der Höhe und circadianen Rhythmik der gemessenen Aktivität festgestellt werden. So zeigte sich in den ersten sechs Stunden des dritten Versuchstages keine signifikante Veränderung der lokomotorischen Aktivität. Die

gemessenen 1-Std-MW erreichten Werte zwischen 62 ± 12 ac und 107 ± 36 ac und ergaben einen 6-Std MW von 490 ± 57 ac, der sich statistisch nicht von der ersten Tagesphase des ersten Versuchstages unterschied (Tag 3, Stunden 49-54). Im Verlauf der zweiten Tageshälfte des dritten Versuchstages konnten ähnliche Werte der lokomotorischen Aktivität ermittelt werden. So bewegten

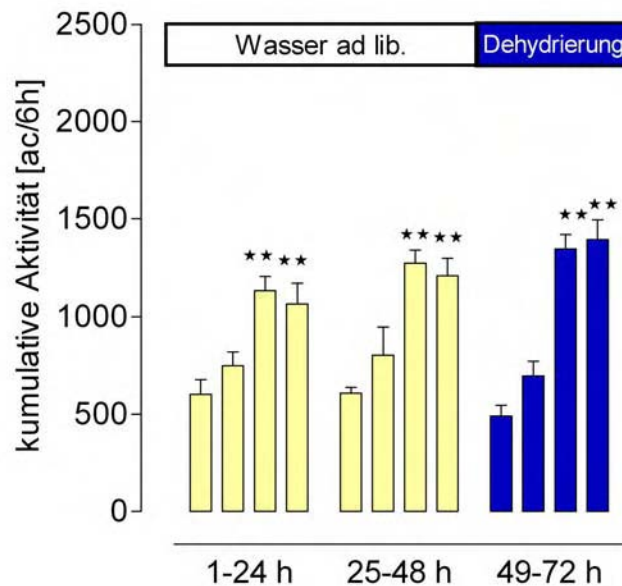


Abb. 37: Darstellung des 6-Std-MW der lokomotorischen Aktivität der Versuchsgruppe D

Aus den 1-Std-MW jedes Tieres der Versuchsgruppe wurden zum statistischen Vergleich kumulative 6-Std-MW erhoben. Aus diesen wurden die 6-Std-MW für die Gruppe errechnet und mit SEM in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Sternchen (*) repräsentieren statistische Signifikanzen für den direkten Vergleich der Nachtphasen und der 2. Tagphase mit der ersten Tagphase eines jeden Tages. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$) ($n=5$).

sich die 1-Std-MW zwischen 68 ± 10 ac und 193 ± 32 ac (Tag 3, Stunden 55-60) und der daraus resultierende 6-Std-MW von 697 ± 76 ac unterschied sich weder im Vergleich zur ersten Tagesphase des dritten als auch des ersten Versuchstages (Abb. 36 und 37). Wie auch unter Euhydrierung stellten sich die beiden Nachtphasen des dritten Versuchstages der circadianen Rhythmik entsprechend als aktiviere Zeitperioden dar. Die 1-Std-MW der ersten Nachtphase erreichten Werte zwischen 161 ± 40 ac und 280 ± 20 ac und ergaben einen 6-Std-MW von 1345 ± 74 ac (Tag 3, Stunden 61-66), der sich im statistischen

Vergleich signifikant ($2p \leq 0,01$) von der ersten Tagesphase des dritten Versuchstages, nicht jedoch von der ersten Nachtphase des ersten Versuchstages unterschied. Auch in der zweiten Nachthälfte ließ sich eine höhere lokomotorische Aktivität erkennen. Die 1-Std-MW bewegten sich zwischen 207 ± 37 ac und 286 ± 11 ac. Der daraus ermittelte 6-Std-MW betrug 1393 ± 101 ac und war ebenfalls im Vergleich mit der ersten Tagesphase des dritten Versuchstages, nicht aber mit der zweiten Nachtphase des ersten Versuchstages signifikant erhöht verschieden ($2p \leq 0,01$) (Abb. 37).

3.1.5. Einfluss der thermischen, osmotischen und Volumen-Stimulationen auf das EZF-Kompartiment

3.1.5.1. Hämatokritwert

Die Bestimmung des Hämatokritwertes (Hkt) ermöglichte eine Aussage über Änderungen des Plasmavolumens und damit indirekt, wenn auch eingeschränkt, auch des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens. Die euthermie und euhydrierte Kontrollgruppe (K) wies einen mittleren Hkt von $0,48 \pm 0,003$ [L/L] auf. Milde Wärmexposition (30°C RT; Gruppe A) bei freiem Zugang zu Trinkwasser bedingte einen geringfügigen, aber signifikanten ($2p \leq 0,05$) Anstieg der Hkt-Werte auf $0,50 \pm 0,003$ [L/L], gleichbedeutend mit marginaler Verminderung des Plasma- und EZF-Volumens (Abb. 38). Die Hkt-Werte der Versuchsgruppen B – D erwiesen sich im Vergleich zu Gruppe A als signifikant erhöht ($2p \leq 0,01$). Die Reduktion des Plasma- und EZF-Volumens war bei Hitzeexposition (33°C RT; Gruppe B) mit Hkt-Werten von $0,56 \pm 0,009$ [L/L] im Vergleich sowohl zur Kontroll- ($2p \leq 0,01$) als auch wärmeexponierten Gruppe A ($2p \leq 0,01$) signifikant ausgeprägt und weist daraufhin, dass die hitzebedingten Evaporationsverluste nicht mehr durch vermehrte Trinkwasseraufnahme kompensiert werden konnten (Abb. 38).

Die intraperitoneale PEG-Behandlung der Versuchstiere in Gruppe C führte zu einem ausgeprägten, onkotisch bedingten Wasserstrom aus dem intravasalen in das interstitielle Flüssigkeitskompartiment, und damit einem markanten, signifikanten Anstieg der Hkt-Werte auf $0,60 \pm 0,005$ im Vergleich zur Kontrollgruppe

K ($2p \leq 0.01$) sowie allen anderen Versuchsgruppen ($2p \leq 0.01$). Bei Versuchstiergruppe D bewirkte der 24-stündige Trinkwasserentzug eine ausreichende Dehydratation des EZF-Raumes, messbar unter anderem durch eine signifikante Erhöhung des Hkt auf $0,53 \pm 0,007$ ($2p \leq 0.01$) im Vergleich zu den Gruppen K und A. Andererseits fiel die Hkt-Erhöhung signifikant geringer aus als bei den Gruppen mit Hitzeexposition bzw. PEG-Behandlung, B ($2p \leq 0.05$) und C ($2p \leq 0.01$) (Abb. 38).

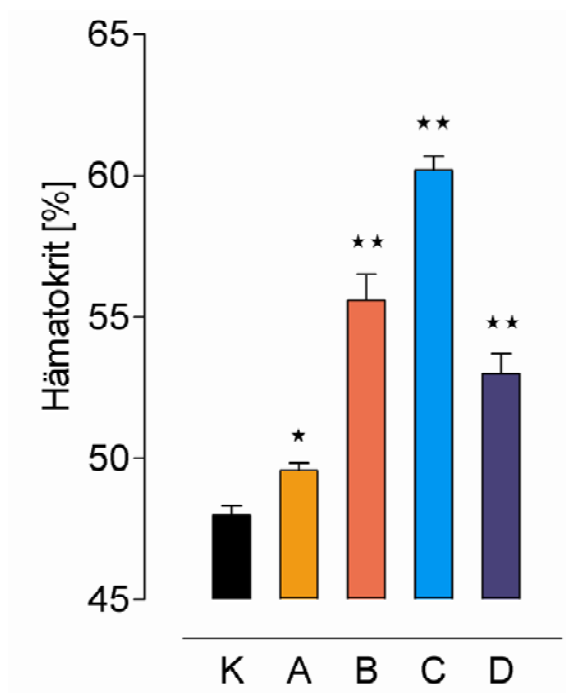


Abb. 38: Darstellung des Hämatokritwertes [L/L] nach osmoregulatorischen und/oder thermischen Stimulationen

Anhand der gemessenen Hämatokritwerte der einzelnen Versuchstiere wurde der mittlere Hämatokritwert für die jeweilige Versuchsgruppe bestimmt und als arithmetischer Mittelwert \pm SEM dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. ($n=5$ pro Gruppe). Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (* $2p \leq 0,05$; ** $2p \leq 0,01$).

K: Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser *ad libitum*
 A: milde Wärmeexposition – 48 h bei 30°C RT, Wasser *ad libitum*
 B: Hitzestress – 48 h bei 33°C RT, Wasser *ad libitum*
 C: isotone Hypovolämie - PEG i.p., 23°C RT
 D: Dehydrierung - 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT

3.1.5.2 Plasmaosmolalität und -Natriumkonzentration

Die Bestimmung der Plasmaosmolalität sowie der Plasma-Natriumkonzentration ermöglichte Aussagen über die Tonizität der EZF und eingeschränkt dessen Gesamtvolumen (Plasma und Interstitium) aufgrund der transkapillären Diffusibilität für kleine Moleküle. Die mittlere Plasmaosmolalität der Kontrollgruppe K lag bei $291,1 \pm 0,4$ mosm/kg (Abb. 39). In der Versuchsgruppe A bewirkte die milde Wärmeexposition (48 h, 30°C RT) keine signifikante Änderung der Tonizität der EZF ($291,0 \pm 0,5$ mosm/kg) im Vergleich zur euthermen Kontrollgruppe. Die Flüssigkeitsverluste über evaporative Wärmeabgabemechanismen konnten

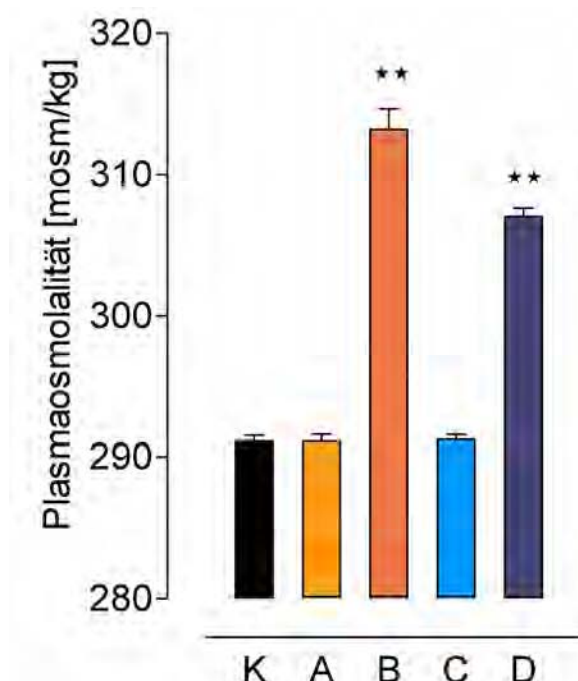


Abb. 39: Darstellung der mittleren Plasmaosmolalität nach osmoregulatorischen und/oder thermischen Stimulationen

Aus den berechneten mittleren Plasmaosmolalitäten einzelner Versuchstiere jeder Versuchsgruppe wurde der Mittelwert für jede Versuchsgruppe bestimmt und als arithmetischer Mittelwert \pm SEM dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. (n=5 pro Gruppe). Gemäß nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangests (** 2p \leq 0,01)

K: Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser *ad libitum*
 A: milde Wärmeexposition – 48 h bei 30°C RT, Wasser *ad libitum*
 B: Hitzestress - 48 h bei 33°C RT, Wasser *ad libitum*
 C: isotone Hypovolämie - PEG i.p., 23°C RT
 D: Dehydrierung- 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT

offensichtlich durch eine gesteigerte Trinkwasseraufnahme (siehe Kap. 3.1.1.3) ausgeglichen werden. Im Rahmen der Hitzeeinwirkung der Versuchstiergruppe B (48 h, 33°C RT) stieg die gemessene Plasmaosmolalität auf $313,2 \pm 1,5$ mosm/kg an und unterschied sich somit signifikant zur Kontrollgruppe K ($2p \leq 0,01$) (Abb. 39). Die thermoregulatorisch induzierten, evaporatorischen Flüssigkeitsverluste (inklusive *perspiratio insensibilis*) konnten hier nicht mehr durch eine entsprechend stimulierte Trinkwasseraufnahme kompensiert werden.

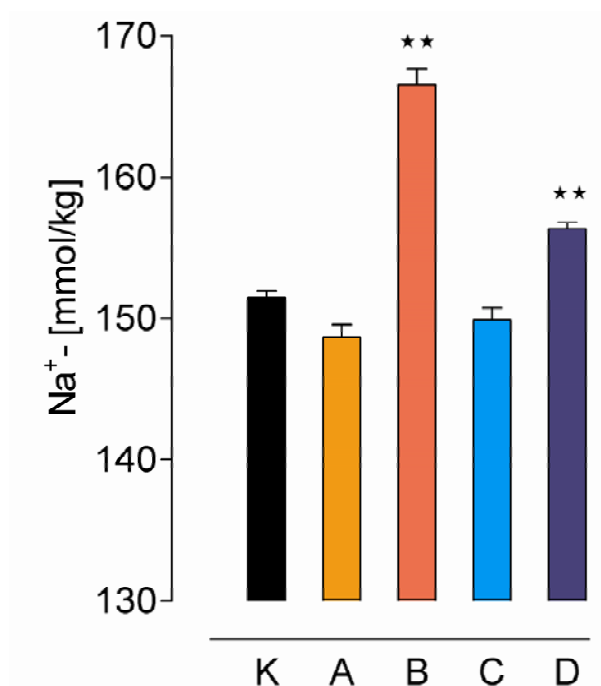


Abb. 40: Darstellung der mittleren Plasma-Na⁺-Konzentration [mmol/L] nach osmoregulatorischen und/oder thermischen Stimulationen

Aus den erhobenen mittleren Plasma-Na⁺-Konzentrationen der einzelnen Versuchstiere jeder Versuchsgruppe wurde der Mittelwert für jede Versuchsgruppe bestimmt und als arithmetischer Mittelwert \pm SEM dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangests (** $2p \leq 0,01$).

K: Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser *ad libitum*
A: milde Wärmeexposition – 48 h bei 30°C RT, Wasser *ad libitum*
B: Hitzestress – 48 h bei 33°C RT, Wasser *ad libitum*
C: isotone Hypovolämie- PEG i.p., 23°C RT
D: Dehydrierung – 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT

Durch die i.p. Applikation von PEG bei der Tierversuchsgruppe C konnte keine signifikante Änderung der EZF-Tonizität festgestellt werden ($291,2 \pm 0,3$ mosm/

kg), weshalb die induzierte intravasale Hypovolämie als isoton zu definieren ist. Die 24-stündige Dehydrierung der Versuchstiere der Gruppe D bewirkte einen signifikanten Anstieg der Plasmaosmolalität auf $307,0 \pm 0,6$ mosm/kg ($2p \leq 0,01$), verglichen mit der euhydrierten Kontrollgruppe K (Abb. 39). Flüssigkeitsverluste z.B. durch Respiration, evaporative Wärmeabgabe oder Stoffwechselvorgänge führten bei diesen Tieren zu einem Anstieg der EZF-Tonizität. Im Vergleich der Versuchstiergruppen untereinander zeigte sich, dass die Hitzeexposition der Gruppe B und der Trinkwasserentzug der Gruppe D im Hinblick auf die Versuchstiergruppen A und C einen starken Anstieg der Plasmaosmolalität bewirkten ($2p \leq 0,01$).

Bei der experimentellen Erfassung der Plasma-Natriumkonzentration der Versuchstiere wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe von $151,5 \pm 0,5$ mmol/kg zum statistischen Vergleich zugrunde gelegt (Abb. 40). Bei Versuchsgruppe A mit einer Na^+ -Konzentration des Plasma von $148,7 \pm 0,9$ mmol/kg konnte kein Einfluss der milden Wärmeexposition festgestellt werden. Eine signifikante Erhöhung der Plasma- Na^+ -Konzentration auf $166,5 \pm 1,2$ mmol/kg im Vergleich zur Kontrollgruppe K zeigte sich bei der Versuchsgruppe B unter Bedingungen der Hitzeexposition. Die Applikation von PEG in die Bauchhöhle der Versuchstiere der Versuchsgruppe C führte - wie aufgrund der Daten für die Plasmaosmolalität zu erwarten - zu keiner signifikanten Erhöhung der Plasma- Na^+ -Konzentration ($149,9 \pm 0,9$ mmol/kg) (Abb. 40). Bei der Versuchsgruppe D konnte ein moderater Anstieg der Plasma- Na^+ -Konzentration auf $156,4 \pm 0,40$ mmol/kg verzeichnet werden, welcher im Vergleich zur Kontrollgruppe K sowie den Gruppen A und C signifikant erhöht war ($2p \leq 0,01$). Im Vergleich der Versuchstiergruppen untereinander zeigten sich mit der Plasmaosmolalität vergleichbare Ergebnisse. Die Tiere der Versuchsgruppe B erreichten die stimulationsbedingten, höchsten Plasma- Na^+ -Konzentrationen, die im Vergleich zu den Versuchstiergruppen K, A und C hoch signifikant ($2p \leq 0,01$), und zur Versuchsgruppe D signifikant ($2p \leq 0,05$) verschieden waren.

3.1.6. Abschließende Betrachtung der telemetrischen Untersuchungen

Bei den Versuchsgruppen A - D sollte während thermischer, osmo- oder volumenregulatorischer Stimulationen deren Auswirkung auf die Körperkerntemperatur, die lokomotorische Aktivität, die Trinkwasseraufnahme und Blutparameter als Maß für Änderungen der EZF untersucht werden.

Bei Versuchsgruppe A sollte durch die Erhöhung der RT auf 30°C für 48 Stunden mit Zugang zu Trinkwasser *ad libitum* eine selektive Stimulation des thermoregulatorischen Regelkreises bei unverändertem EZF-Status erreicht werden. Während der 48-stündigen Wärmexposition zeigte sich lediglich in den zweiten Nachtphasen (Tag 3 und 4, Stunden 67-72 bzw. 91-96) ein signifikanter Anstieg der KT um 0,3 - 0,4°C im Vergleich zu den entsprechenden Nachtphasen bei 23°C RT. Die lokomotorische Aktivität blieb durch die Anhebung der RT auf 30°C weitestgehend unbeeinflusst. Die circadiane Rhythmik von Körperkerntemperatur und lokomotorischer Aktivität blieb während der gesamten Stimulation erhalten. Während der ersten Tagesphase des vierten Versuchstages ließ sich eine vermehrte Wasseraufnahme verzeichnen, die zusammen mit einem geringfügigen Anstieg während der zweiten Nachtphasen schließlich zu einem partiellen Verlust der circadianen Rhythmik der Trinkwasseraufnahme führte. Plasmaosmolalität und Na⁺-Konzentration zeigten sich als unverändert im Vergleich zur euthermen, euhydrierten Kontrollgruppe. Der Hämatokritwert erwies sich lediglich als leicht, wenngleich signifikant erhöht, was auf eine geringfügige Reduktion des Plasmavolumens bzw. des EZV zurückzuführen war. Die 48-stündige Wärmeexposition mit Trinkwasser *ad libitum* stellte somit einen relativ „reinen“ thermischen Stimulus ohne ausgeprägte Beeinflussung des osmoregulatorischen Regelkreises dar.

Bei der Versuchsgruppe B sollte durch Anhebung der RT um weitere 3°C auf 33,0°C (leichter Hitzestress) bei Trinkwasser-Verfügbarkeit *ad libitum* zusätzlich zum thermoregulatorischen auch die osmo- und volumenregulatorischen Regelkreise beeinflusst werden. Im Gegensatz zur Versuchsgruppe A zeigten sowohl die erste, als auch zweite Nachtphase des dritten und vierten Versuchstages signifikante Erhöhungen der KT um 0,95 – 1,1°C im Vergleich zu Nacht-

phasen bei 23°C. Im Verlauf des zweiten Tages bei 33°C RT erwiesen sich auch schon die beiden Tagesperioden als hoch signifikant um 1,2 - 1,4°C gegenüber gleichen Zeitzonen bei 23°C RT erhöht. Die circadiane Rhythmik der KT erwies sich als gedämpft und weniger ausgeprägt. Kompensationsversuche spiegeln sich in einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität wider, die bereits in der zweiten Tageshälfte des ersten thermischen Stimulationstages sprunghaft anstieg, bei zeitgleicher Erhöhung der diurnalen, eingeschränkt auch nocturnalen Trinkwasseraufnahme. Die circadiane Rhythmik von lokomotorischer Aktivität und Trinkwasseraufnahme war nur noch begrenzt nachweisbar. Eine Kompensation des KT-Anstiegs durch vermehrte Trinkwasseraufnahme und aktivierte Wärmeabgabe (nicht experimentell erfasst) war somit zu diesem Zeitpunkt nicht mehr gewährleistet. Die signifikante Erhöhung des Hkt-Wertes sowie der Osmolalität und Na⁺-Konzentration des Plasmas deuten auf die Manifestation einer deutlichen, hypertonen intravasalen (extrazellulären) Hypovolämie hin. Die 48-stündige Hitzeexposition mit Trinkwasser *ad libitum* stellte somit einen kombinierten Stimulus der thermischen, osmo- und volumenregulatorischen Regelkreise dar.

Bei der Versuchsgruppe C sollte durch die i.p. Applikation von PEG eine isotone, intravasale Hypovolämie und somit eine Stimulation des volumenregulatorischen Regelkreises bewirkt werden. Anhand des aufgezeichneten Temperaturverlaufs konnte gezeigt werden, dass durch den Vorgang der intraabdominalen Injektion von PEG keine stressbedingte Hyperthermie ausgelöst wurde. Die lokomotorische Aktivität der Versuchstiere erwies sich als nicht unterschiedlich zu derjenigen Tageszeit-gleicher Phasen der Kontrolltage. Der hoch signifikante Anstieg des Hämatokritwertes bei unveränderten Werten für Plasmaosmolalität und Na⁺-Konzentration wiesen auf eine isotone, intravasale Hypovolämie hin. Die i.p. PEG-Behandlung repräsentierte somit einen „reinen“ Volumenstimulus zumindest die intravasale Komponente der EZF betreffend.

Bei den Tieren der Versuchsgruppe D sollte durch den Entzug des Trinkwassers eine Beeinflussung des osmoregulatorischen Regelkreises erreicht werden. Um eine dehydrationsbedingte Hyperthermie zu vermeiden, wurde der Wasserentzug daher auf 24 Stunden begrenzt. Bei unbeeinflusster circadianer Rhyth-

mik der KT und der lokomotorischen Aktivität im Verlauf der Dehydratationsversuche konnten absolute Temperatur- und Aktivitätswerte nahezu identisch mit denjenigen während der Kontrollperioden mit freiem Zugang zu Trinkwasser ermittelt werden. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Hämatokritwertes und ein deutlicher Anstieg sowohl der Plasmaosmolalität als auch der Plasma- Na^+ -Konzentration, was eindeutig auf eine Dehydrierung des EZF-Kompartimentes hinweist. Der 24-stündige Wasserentzug stellte somit einen Stimulus des osmoregulatorischen Regelkreises dar, bei möglicherweise partieller Co-Aktivierung der Volumenregulation.

3.2. Thermische, osmo- und volumenregularisache Aktivierung hypothalamischer Neurone

3.2.1. Quantitative Analyse induzierter neuronaler Fos-Translokation im *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO)

Die für die Versuchsgruppen A – D beschriebenen thermo-, osmo- und/oder Volumen-regulatorischen Aktivierungsansätze, einschließlich der detaillierten Charakterisierung ihrer Auswirkungen auf Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität oder Trinkverhalten bildeten die Grundlage für die nachfolgende Analyse neuronaler Aktivierungsmuster. Dazu wurden im Bereich des *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) sowie des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) im anterioren Hypothalamus des Rattengehirns bei Kontrolltieren (K), Tieren nach milder Wärmeexposition (A) oder Hitzestress (B), sowie Tieren nach PEG-Behandlung (C) bzw. milder Dehydratation (D) die Anzahl derjenigen Neurone in 40 μm dicken Gehirnschnittpräparationen (siehe Kap. 2.4.5) quantitativ erfasst, bei welchen sich immunhistochemisch eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors Fos nachweisen ließ.

3.2.1.1. Anteriorer *Nucleus praeopticus medianus* (aMnPO)

Um die stimulationsbezogene Expression und nukleäre Translokation des Fos-Proteins analysieren zu können, wurde zunächst die Fos-Expression in der Gruppe der unstimulierten Kontrolltiere (Gruppe K) im Bereich des anterioren MnPO (aMnPO) bestimmt. Unter euhydrierten, euthermen Kontrollbedingungen

wiesen im aMnPO 15 ± 5 Zellen pro $40 \mu\text{m}$ Gewebsschnitt in den Zellkern transloziertes Fos auf (Abb. 41). Nach milder Wärmeexposition (Gruppe A; 48 h 30°C) erfolgte die nukleäre Translokation des Fos-Proteins in 93 ± 11 Neuronen pro $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt, und in der hitzestressierten Versuchsgruppe B (48 h, 33°C) konnten mit 174 ± 25 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ im aMnPO die höchste Translokationsrate des Fos-Proteins demonstriert werden (Abb. 41). Die i.p. Applikation von PEG (Gruppe C) hatte für den aMnPO in 77 ± 4 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt eine immunhistochemisch detektierbare Translokation des Fos-Proteins zur Folge, während dies bei den dehydrierten Tieren der Versuchsgruppe D bei vergleichbaren 79 ± 7 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt der Fall war (Abb. 41). Beim statistischen Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen mit den Basalwerten der

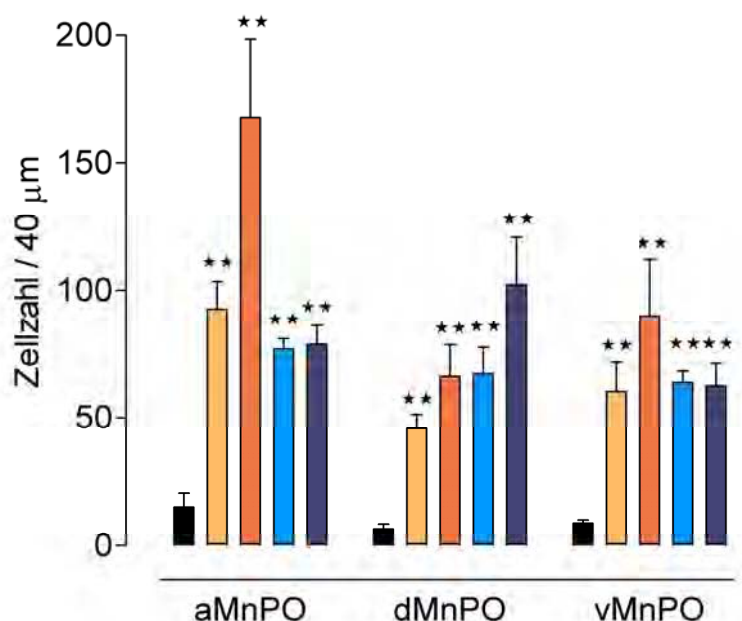


Abb. 41: Anzahl Fos-positiver Neurone in den Substrukturen des MnPO nach milder Wärmeexposition, Hitzestress, Hypovolämie und Dehydrierung

Für jedes Versuchstier wurde die aus mehreren ($n \geq 3$) Gewebsschnitten ($40 \mu\text{m}$) arithmetisch bestimmte Zellzahl/Schnitt Fos-positiver Neurone (= deren Zellkerne) in der jeweiligen Substruktur des MnPO bestimmt. Aus diesen wurde die gemittelte Zellzahl für jede Versuchstiergruppe erhoben und die daraus resultierenden Mittelwerte mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$) ($n=5$).

| | | |
|-------------|-----|---|
| Schwarz: | (K) | Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser <i>ad lib</i> . |
| Orange: | (A) | Milde Wärmeexposition; 48 h bei 30°C RT, Wasser <i>ad lib</i> . |
| Rot: | (B) | Hitzestress; 48 h bei 33°C RT, Wasser <i>ad libitum</i> |
| Hellblau: | (C) | Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT |
| Dunkelblau: | (D) | Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT |

Kontrollgruppe (K) erwiesen sich die erhobenen Zellzahlen jeder Versuchsgruppe als hoch signifikant verschieden ($2p \leq 0,01$). Die unter den Versuchsbedingungen des Hitzestresses ermittelten Daten zeigten eine signifikant stärkere neuronale Aktivierung im Bereich des aMnPO als nach PEG-Behandlung oder Dehydrierung, nicht jedoch der milden Wärmeexposition ($2p \leq 0,01$).

3.2.1.2. Dorsaler *Nucleus praeopticus medianus* (dMnPO)

Im dorsal der *Commissura anterior* lokalisierten, triangulären Anteil des MnPO (dMnPO) betrug die Zahl der unter unstimulierten Kontrollbedingungen Fos-immunopositiven Neurone lediglich 7 ± 2 pro $40 \mu\text{m}$ (Abb. 41). Nach milder Wärmeexposition der Versuchsgruppe A konnten hingegen 46 ± 6 als Fos-immunopositive, mit im Zellkern lokalisierter Antigenmarkierung charakterisierte Neurone pro $40 \mu\text{m}$ Gewebsschnitt nachgewiesen werden (Abb. 41). In der Versuchsgruppe B bewirkte die Anhebung der RT auf 33°C eine nukleäre Expression des Fos-Proteins in 71 ± 11 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt. Die intravasale Hypovolämie der Versuchsgruppe C induzierte eine nukleäre Translokation von Fos in einer mit 67 ± 11 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt vergleichbar hohen Anzahl an dMnPO-intrinsischen Neuronen. Im Rahmen der osmotischen Stimulation durch Dehydrierung konnte, unterschiedlich vom aMnPO, die höchste Zellzahl Fos-positiver Neurone mit 102 ± 18 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ im dMnPO festgestellt werden (Abb. 41). Die für jeden der vier experimentellen Versuchsgruppen erhobenen Werte erwiesen sich als hoch signifikant zur Kontrollgruppe K erhöht ($2p \leq 0,01$). Beim direkten Vergleich der Gruppen A – D untereinander konnte lediglich der Unterschied in zellulärer Fos-Expression zwischen den Gruppen D und A als signifikant ($2p \leq 0,01$) ermittelt werden.

3.2.1.3. Ventraler *Nucleus praeopticus medianus* (vMnPO)

Der zwischen der dorsalen Begrenzung des anterioren dritten Hirnventrikels (V III) und der *Commissura anterior* auf gleicher coronaler Ebene wie der dMnPO gelegene ventrale MnPO (vMnPO) wies für die Kontrollgruppe K eine geringfügige Expression des Fos-Proteins in durchschnittlich lediglich 9 ± 1 Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gewebsschnitt auf (Abb. 41). Wärmeexposition für 48 h bei 30°C

verursachte die nukleäre Translokation des Fos-Proteins in 60 ± 12 Zellen/40 μm Geweberschnitt, und nach Hitzeexposition (Versuchsgruppe B) konnte der höchste Wert mit 86 ± 18 Zellen/40 μm dokumentiert werden. Die durch PEG-Behandlung sowie milde Dehydrierung bewirkte Aktivierung von 64 ± 5 bzw. 62 ± 9 Zellen/40 μm Neuronen des vMnPO Neurone waren einander vergleichbar. Wie auch für die beiden anderen Substrukturen des MnPO erwähnt, zeigten sich alle ermittelten Zellzahlen als zur Kontrolle signifikant erhöht ($2p \leq 0,01$) (Abb. 41). Im statistischen Vergleich der Versuchsgruppen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

3.2.2. Neuronale Aktivierungsmuster im *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO)

Betrachtet man die Verteilung Fos-positiver Neurone im Bereich der drei Substrukturen des MnPO, so lassen sich je nach physiologischem Versuchsansatz (Gruppen A – D) unterschiedliche Aktivierungsmuster der Neuronenpopulationen feststellen (Abb. 42 und 43). Den aMnPO betreffend ergab sich bei milder Wärmeexposition (Gruppe A) eine Akkumulation Fos-positiver Neurone im untersten Drittel des dorso-ventral verlaufenden aMnPO, knapp oberhalb des sich öffnenden dritten Hirnventrikels. Die experimentell erzeugte intravasale Hypovolämie (Gruppe C) bedingte eine äquipotente Fos-Translokation primär in Neuronen der ventralen Hälfte des aMnPO (Abb. 42 und 43). Dehydrierung (Gruppe D) sowie Hitzeexposition einhergehend mit extrazellulärer Dehydrierung (Gruppe B) hingegen verursachten eine gleichmäßige Verteilung des Fos-Signals innerhalb des linear ausgerichteten aMnPO.

Im Bereich des dMnPO ließen sich ebenfalls unterschiedliche Lokalisationen der induzierten Fos-Signale dokumentieren. Die neuronale Aktivierung durch Wärme- bzw. Hitzeexposition (Versuchsgruppen A, B) bewirkte eine moderate Fos-Expression vor allem in den lateralen Außenzonen des triangulären dMnPO (Abb. 42 und 43). Die PEG-Behandlung (Gruppe C) induzierte die nukleäre Translokation von phosphoryliertem homo- oder heterodimeren Fos in zahlreichen Neuronen mit uniformer Verteilung in der ventralen Komponente des dMnPO, wohingegen die ausgeprägte Aktivierung von dMnPO-intrinsischen

Nervenzellen durch den 24-stündigen Wasserentzug der Gruppe D eine ubiquitäre, zentralisiert homogene Fos-Markierung bei hoher Zelldichte zur Folge hatte (Abb. 42 und 43).

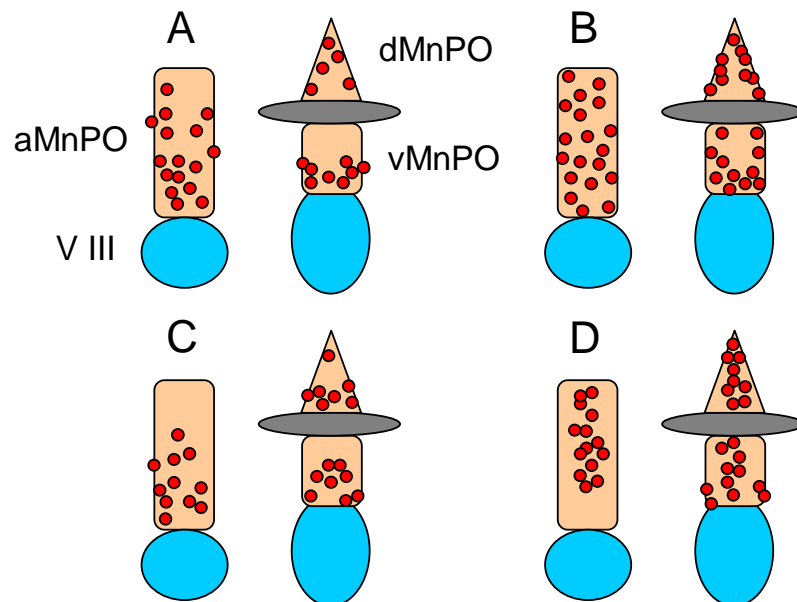


Abb. 42: Schematische Darstellung der Verteilungsmuster Fos-positiver Neurone im MnPO der Versuchsgruppen A-D.

Verteilungsmuster immunpositiver Fos-Signale nach dessen stimulationsabhängiger Translokation in den Zellkern MnPO-intrinsischer Neurone. Darstellung der Fos-spezifischen Immunreaktivität in Neuronen des anterioren MnPO (aMnPO), dorsalen MnPO (dMnPO) sowie ventralen MnPO (vMnPO).

Blau: dritter Hirnventrikel (V III), grau: *Commissura anterior*, rot: Fos-positive Neurone

- (A) Milde Wärmeexposition; 48 h bei 30°C RT, Wasser *ad libitum*
- (B) Hitzestress; 48 h bei 33°C RT, Wasser *ad libitum*
- (C) Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT
- (D) Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT

Im ventralen MnPO zeigte sich eine vergleichbar markante neuronale Aktivierung für alle vier Versuchsgruppen, wobei durch Wärme-/Hitzeexposition induzierte Fos-Signale ventrikelnah bzw. in den Randbereichen lokalisiert waren. Durch Hypovolämie bzw. Dehydratation hervorgerufene Verteilungsmuster aktivierter Neurone deuteten auf eine eher im zentralen Bereich des vMnPO nachweisbare Fos-Translokation hin (Abb. 42 und 43).

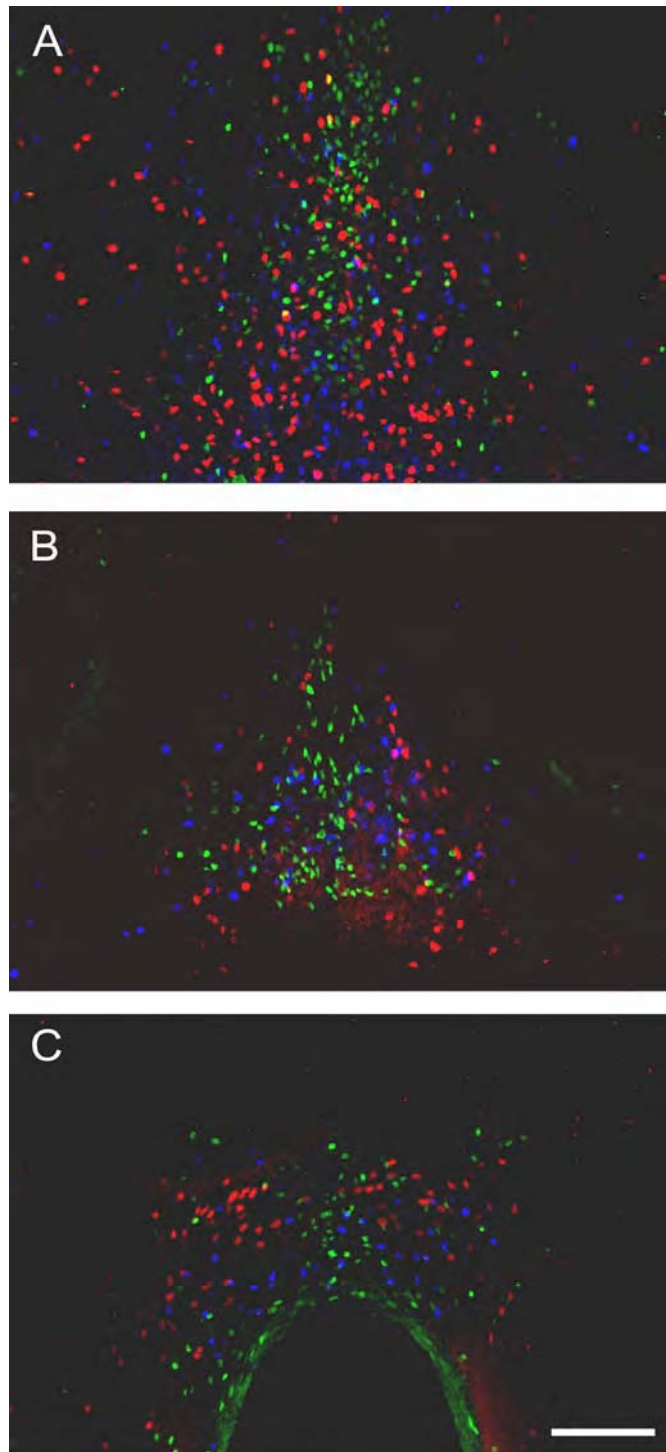


Abb. 43: Immunhistochemische Darstellung der Verteilungsmuster Fos-positiver Neurone im MnPO der Versuchsgruppen A, C und D im Schnitt.

Superpositionierte Darstellung Fos-positiver Neurone in den Substrukturen des MnPO nach Wärmeexposition (48 h, 30°C, Gruppe A) (**Rot**), Dehydrierung (24 h, 23°C, Gruppe D) (**Grün**) und durch PEG-Behandlung erzeugte intravasale Hypovolämie (Gruppe C) (**Blau**).

(A) aMnPO, (B) dMnPO, (C) vMnPO

Balken entspricht 100 µm

3.2.3. Aktivierung nNOS-positiver Neurone im MnPO

Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) stellt das generierende Enzym für Stickstoffmonoxid (NO) als einem wesentlichen Neuromodulator des MnPO der Ratte im Rahmen der Homöostase von Körperkerntemperatur und extrazellulärem Flüssigkeitskompartiment dar (Gerstberger *et al.*, 2001). In den immunhistologischen Untersuchungen wurde daher der Frage nachgegangen, inwieweit die thermo-, osmo- bzw. volumenregulatorischen Stimulationen (Versuchsgruppen A – D) zu einer nukleären Fos-Translokation als Marker neuro-naler Aktivierung in nitrergen bzw. nicht-nitrergen Neuronen des MnPO führten.

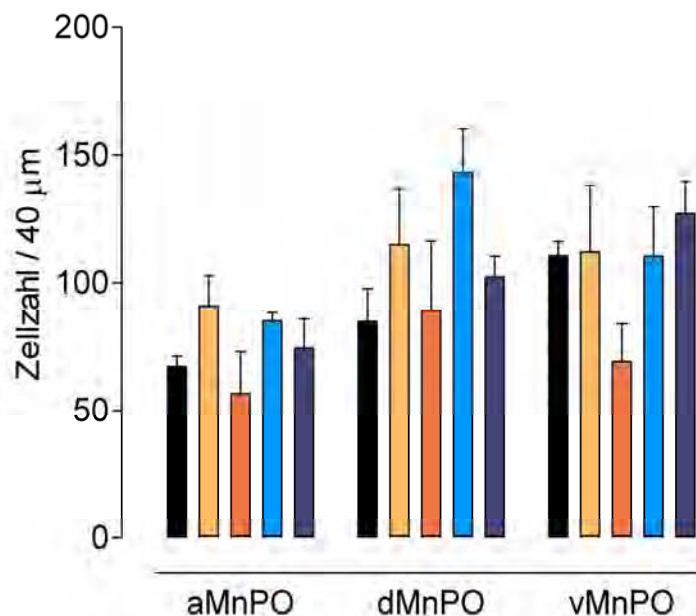


Abb. 44: Anzahl nNOS-positiver Neurone in den Substrukturen des MnPO nach milder Wärmeexposition, Hitzestress, Hypovolämie und Dehydrierung

Für jedes Versuchstier wurde die aus mehreren ($n \geq 3$) Gewebsschnitten (40 µm) arithmetisch bestimmte Zellzahl/Schnitt nNOS-positiver Neurone in der jeweiligen Substruktur des MnPO bestimmt. Aus diesen wurde die gemittelte Zellzahl für jede Versuchstiergruppe erhoben und die daraus resultierenden Mittelwerte mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ($n=5$).

| | | |
|-------------|-----|--|
| Schwarz: | (K) | Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser <i>ad lib</i> . |
| Orange: | (A) | Milde Wärmeexposition; 48 h bei 30°C RT, Wasser <i>ad lib</i> . |
| Rot: | (B) | Hitzestress; 48 h bei 33°C RT, Wasser <i>ad libitum</i> |
| Hellblau: | (C) | Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT |
| Dunkelblau: | (D) | Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT |

Dabei konnte durch den immunhistochemischen Nachweis der nNOS in den Substrukturen des MnPO (aMnPO, dMnPO, vMnPO) in quantifizierbarer Weise demonstriert werden, dass die Anzahl nNOS-positiver Neurone in den Substrukturen des MnPO nicht stimulationsspezifisch verändert wurde (Abb. 44).

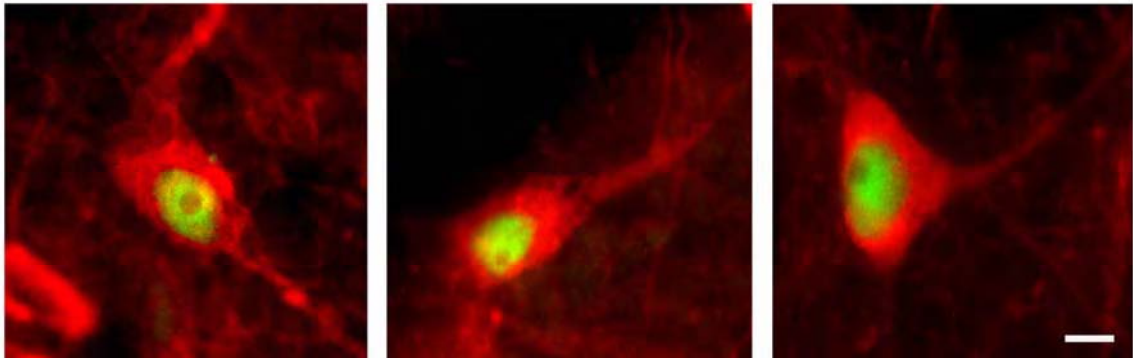


Abb. 45: Co-Lokalisation von Fos und nNOS im MnPO

Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone erfolgte im coronalen Gewebsschnitt auf Ebene des MnPO mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und *polyclonal rabbit anti-Fos* (1:1000) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene nNOS und Fos. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1:800) stellt sich die nNOS als zytoplasmatisches, rotes Signal dar. Zur Visualisierung des nukleär translozierten Fos-Proteins wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet (*biotin-goat-anti-rabbit IgG*, (1:200), der durch an Biotin bindendes *Fluorescein-Avidin D* (1:300) detektiert werden konnte und sich somit im immunhistologischen Bild als nukleäres, grünes Signal darstellte.

Balken entspricht 10 µm

Immunhistochemische Untersuchungen mit kombinierter Markierung für Fos (im Zellkern) und nNOS (im Zytosol) von MnPO-intrinsischen Neuronen ermöglichen unter Zuhilfenahme der Kern-spezifischen DAPI-Färbung (siehe Kap. 2.4.5) den Nachweis einer durch physiologische Stimulation am wachen Tier hervorgerufenen Aktivierung nitrender Nervenzellen des MnPO (Abb. 45). In mindestens drei konsekutiven Gehirnschnitten der Versuchstiere auf coronaler Schnittebene des MnPO erfolgte die Bestimmung der Anzahl Fos- / nNOS positiver Neurone als absolute Zahlen (Abb. 46) sowie prozentualer Anteil der doppelmarkierten Neurone an der Zahl aller Fos-positiven bzw. nNOS-positiven Zellen (Abb. 47).

In den Abb. 48 bis 51 auf den Seiten 138 – 141 werden die Verteilungsmuster der Immunreaktivitäten für zytosolisch lokalisierte nNOS und nukleär transloziertes Fos in den drei Substrukturen des MnPO (aMnPO, dMnPO, vMnPO) anhand exemplarischer immunhistochemischer Aufnahmen dargestellt.

3.2.3.1. Anteriorer *Nucleus praeopticus medianus* (aMnPO)

Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe K ergab sich bei im Mittel 15 Fos-immunpositiven und 75 nNOS exprimierenden Neuronen im Bereich des aMnPO eine Co-Lokalisation von $0,4 \pm 0,2$ Zellen/ 40 μm bezogen auf einen Gehirnschnitt (Nichtnachweisbar aktivierter, nitrerger Neurone) (Abb. 46).

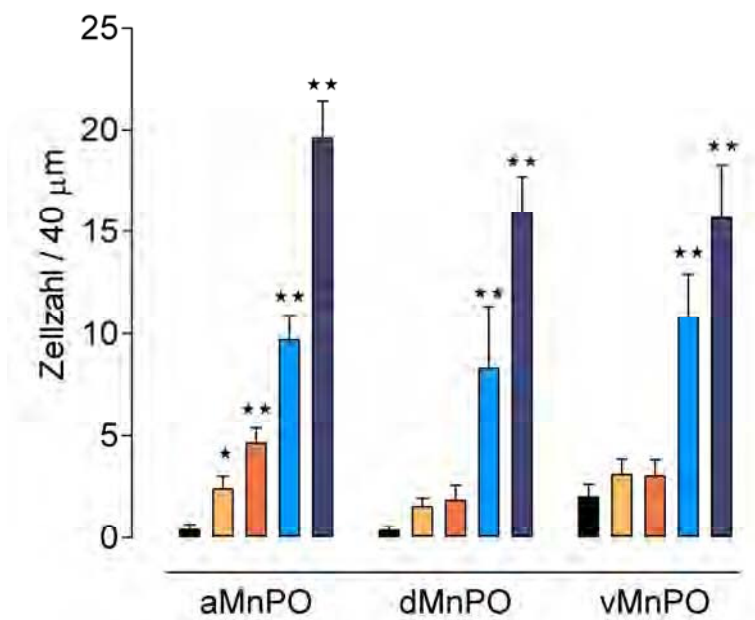


Abb. 46: Anzahl nNOS / Fos-positiver Neurone in den Substrukturen des MnPO nach milder Wärmeexposition, Hitzestress, Hypovolämie und Dehydrierung

Für jedes Versuchstier wurde die aus mehreren ($n \geq 3$) Gewebsschnitten (40 μm) arithmetisch bestimmte Zellzahl der nNOS/Fos-positiven Neurone in der jeweiligen Substruktur des MnPO bestimmt. Aus dieser wurde die mittlere Zellzahl für jede Versuchstiergruppe erhoben und die daraus resultierenden Mittelwerte mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt. Durch Sternchen (**) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$; * $2p \leq 0,05$) ($n=5$).

| | | |
|-------------|-----|--|
| Schwarz: | (K) | Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser <i>ad lib</i> . |
| Orange: | (A) | Milde Wärmeexposition; 48h bei 30°C RT, Wasser <i>ad lib</i> . |
| Rot: | (B) | Hitzestress; 48h bei 33°C RT, Wasser <i>ad libitum</i> |
| Hellblau: | (C) | Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT |
| Dunkelblau: | (D) | Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT |

Durch thermische Stimulation der Versuchstiere (Gruppen A und B) resultierte eine moderate Aktivierung nitrerger Neurone im Bereich des dmNPO. Während nach milder Wärmeexposition im arithmetischen Mittel $2,4 \pm 0,6$ Neurone mit nNOS / Fos Co-Lokalisation pro 40 μm Gehirnschnitt gezählt werden konnten, führte Hitzestress zu einem signifikant ($2p \leq 0,05$) erhöhten Wert von $4,2 \pm 0,7$ Zellen/ 40 μm Gehirnschnitt mit Doppelmarkierung (Abb. 46). Bei einem prozentualen Anteil der doppelmarkierten Neurone an der Gesamtzahl Fos-immunpositiver Neurone von lediglich zwei Prozent, und damit nicht unterschiedlich zur Kontrollgruppe (Abb. 47, oben), errechnete sich bei Hitzestress, nicht jedoch Wärmeexposition, ein 7,4 % Anteil an der Population nitrerger Neurone, und somit signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($2p \leq 0,01$) (Abb. 47, unten).

Insgesamt $9,7 \pm 1,2$ bzw. $19,6 \pm 1,8$ Zellen pro 40 μm Gehirnschnitt mit gemeinsamer nNOS /Fos Expression konnten im Rahmen der isotonen Hypovolämie (Versuchsgruppe C) bzw. Dehydrierung (Versuchsgruppe D) dokumentiert werden (Abb. 46). Diese Werte erwiesen sich als signifikant erhöht im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen A und B ($2p \leq 0,01$). Die prozentualen Anteile an der Gesamtzahl aktivierter, Fos-immunpositiver Neurone zeigten sich mit $10,1 \pm 2,7$ % bzw. $26,0 \pm 3,8$ %, wiederum als hoch signifikant vermehrt im Vergleich zu den Gruppen K, A und B ($2p \leq 0,01$) (Abb. 47, oben). Bezogen auf die Anzahl nNOS-immunopositiver Neurone zeigten sich $11,4 \pm 3,3$ % bzw. $26,4 \pm 5,7$ % als durch Hypovolämie bzw. 24-stündige Dehydrierung aktiviert (Abb. 47, unten).

3.2.3.2. Dorsaler *Nucleus praeopticus medianus* (dmNPO)

In der Gruppe der unstimulierten Kontrolltiere konnte eine durchschnittliche Expression und Translokation des Fos-Proteins in lediglich $0,4 \pm 0,4$ nitrergen Neuronen pro 40 μm Gewebsschnitt verzeichnet werden, gleichbedeutend mit einer Nichtnachweisbarkeit aktivierter, nitrerger Neurone (Abb. 46). Im Unter-

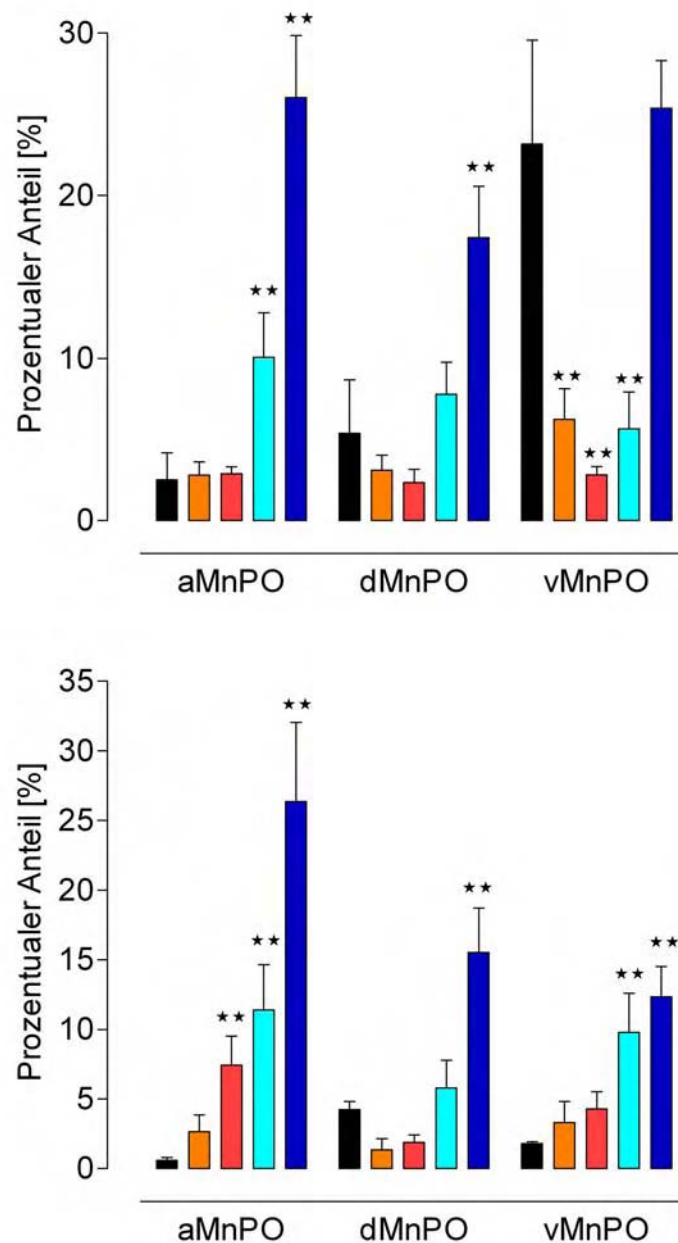


Abb. 47: Prozentualer Anteil nNOS / Fos-positiver Neurone in den Substrukturen des MnPO nach milder Wärmeexposition, Hitzestress, Hypovolämie und Dehydrierung

Für jedes Versuchstier wurde der prozentuale Anteil der nNOS/Fos-positiven Neurone an der Gesamtzahl Fos- (oben) bzw. nNOS-immunpositiver (unten) Neurone in der jeweiligen Substruktur des MnPO bestimmt. Der daraus resultierende Mittelwert für jede Versuchsgruppe wurde mit seinem SEM als Balkendiagramm dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$; * $2p \leq 0,05$) (n=5).

| | | |
|-------------|-----|---|
| Schwarz: | (K) | Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser <i>ad lib.</i> |
| Orange: | (A) | Milde Wärmeexposition; 48 h bei 30°C RT, Wasser <i>ad lib.</i> |
| Rot: | (B) | Hitzestress; 48 h bei 33°C RT, Wasser <i>ad libitum</i> |
| Hellblau: | (C) | Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT |
| Dunkelblau: | (D) | Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT |

schied zum aMnPO zeigte sich im Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe lediglich bei den Gruppen C und D eine signifikante Zunahme der Anzahl von Zellen mit Co-Lokalisation von nNOS und Fos ($2p \leq 0,01$) (Abb. 46). Die $8,3 \pm 3,0$ Zellen pro $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt mit nachgewiesener Co-Lokalisation neuronaler NOS und nukleärem Fos nach PEG-induzierter Hypovolämie entsprachen dabei $7,8 \pm 2,0 \%$ aller Fos-immunopositiven und $5,8 \pm 2,0 \%$ aller nNOS-immunopositiven Neurone des dMnPO (Abb. 47). Mit durchschnittlich $15,9 \pm 1,8$ Zellen pro $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt ergaben sich bei der Versuchsgruppe D prozentuale Anteile der Co-Lokalisation von $17,4 \pm 3,2 \%$ in Bezug auf alle Fos-immunopositiven Neurone bzw. $15,5 \pm 3,2 \%$ in Bezug auf alle nitrergen Neurone des dMnPO. Sowohl Gesamtzahl als auch die jeweils prozentualen Anteile an Zellen mit Co-Lokalisation von nNOS und Fos erwiesen sich als hoch signifikant erhöht zur Kontrollgruppe sowie den Gruppen mit Wärmeexposition und Hitzestress ($2p \leq 0,01$)

3.2.3.3. Ventraler Nucleus praeopticus medianus (vMnPO)

Die Aktivierung nitrerger Neurone der Kontrollgruppe, gehalten bei 23°C RT und Wasser *ad libitum*, betrug im vMnPO $2,0 \pm 0,6$ Zellen/ $40 \mu\text{m}$ (Abb. 46). Die absoluten Zahlen an Neuronen mit Co-Lokalisation zytosolischer nNOS und nukleärem Fos waren denen im dMnPO vergleichbar (Abb. 46). Mit nachgewiesener Co-Lokalisation in lediglich 2 – 3 Neuronen unter den Bedingungen milder Wärmeexposition und Hitzestress, ergaben sich bei induzierter intravasaler Hypovolämie bzw. extrazellulärer Dehydrierung eine Co-Lokalisation in $10,8 \pm 2,1$ bzw. $15,7 \pm 2,5$ Neuronen des vMnPO, und somit signifikant höhere Werte ($2p \leq 0,01$) im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie den Versuchstiergruppen A und B (Abb. 46). Der prozentuale Anteil aktivierter nitrerger Neurone an der Gesamtzahl Fos-positiver Zellen belief sich bei Versuchsgruppe C auf $5,6 \pm 2,2 \%$, bei der Versuchsgruppe D auf $25,4 \pm 2,91 \%$ (Abb. 47, oben). In Bezug auf die Gesamtzahl nNOS exprimierender Zellen ergaben sich Werte von $9,8 \pm 2,8 \%$ bzw. $12,4 \pm 2,2 \%$, und somit signifikant ($2p \leq 0,0X$) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 47, unten).

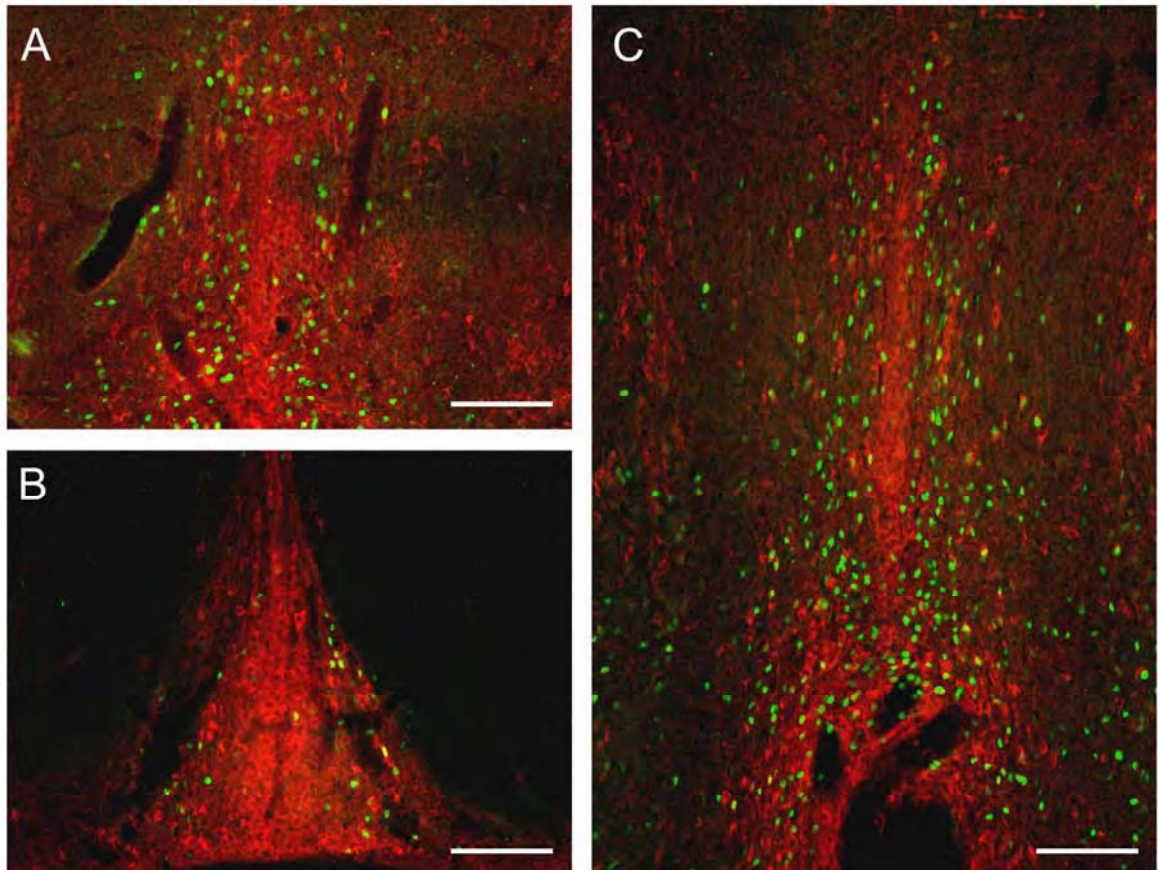


Abb. 48: Darstellung der nNOS/Fos-positiven Neurone in den Substrukturen des MnPO nach 48 stündiger Wärmeexposition (Gruppe A)

Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone erfolgte im immunhistochemischen Schnitt mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und *polyclonal rabbit anti-Fos* (1:1000) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene nNOS und Fos. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1:800) stellte sich die nNOS als zytoplasmatisches, rotes Signal dar. Zur Visualisierung des nukleär translozierten Fos-Proteins wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwandt (*biotin-goat-anti-rabbit IgG*; 1:200), der durch an Biotin bindendes *Fluorescein-Avidin D* (1:300) detektiert werden konnte und sich somit im immunhistologischen Bild als nukleäres, grünes Signal darstellte.

(A) vMnPO (B) dMnPO (C) aMnPO

Balken entspricht 100 μm

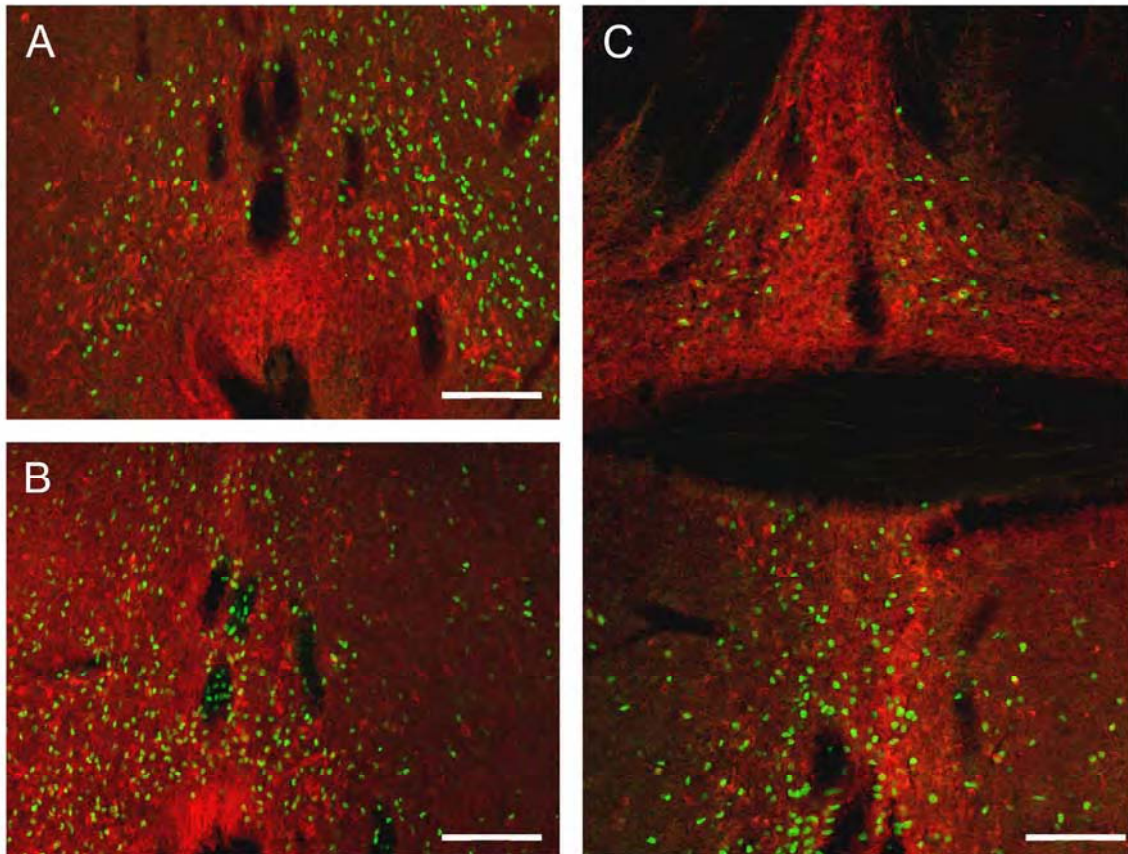


Abb. 49: Darstellung der nNOS/Fos-positiven Neurone in den Substrukturen des MnPO sowie OVLT nach 48-stündigem Hitzestress (Gruppe B)

Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone erfolgte im immunhistochemischen Schnitt mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und *polyclonal rabbit anti-Fos* (1:1000) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene nNOS und Fos. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1 : 800) stellte sich die nNOS als zytoplasmatisches, rotes Signal dar. Zur Visualisierung des nukleär translozierten Fos-Proteins wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwandt (*biotin-goat-anti-rabbit IgG*; 1 : 200), der durch an Biotin bindendes *Fluorescein-Avidin D* (1:300) detektiert werden konnte und sich somit im immunhistologischen Bild als nukleäres, grünes Signal darstellte.

(A) OVLT (B) aMnPO (C) dMnPO & vMnPO

Balken entspricht 100 μm

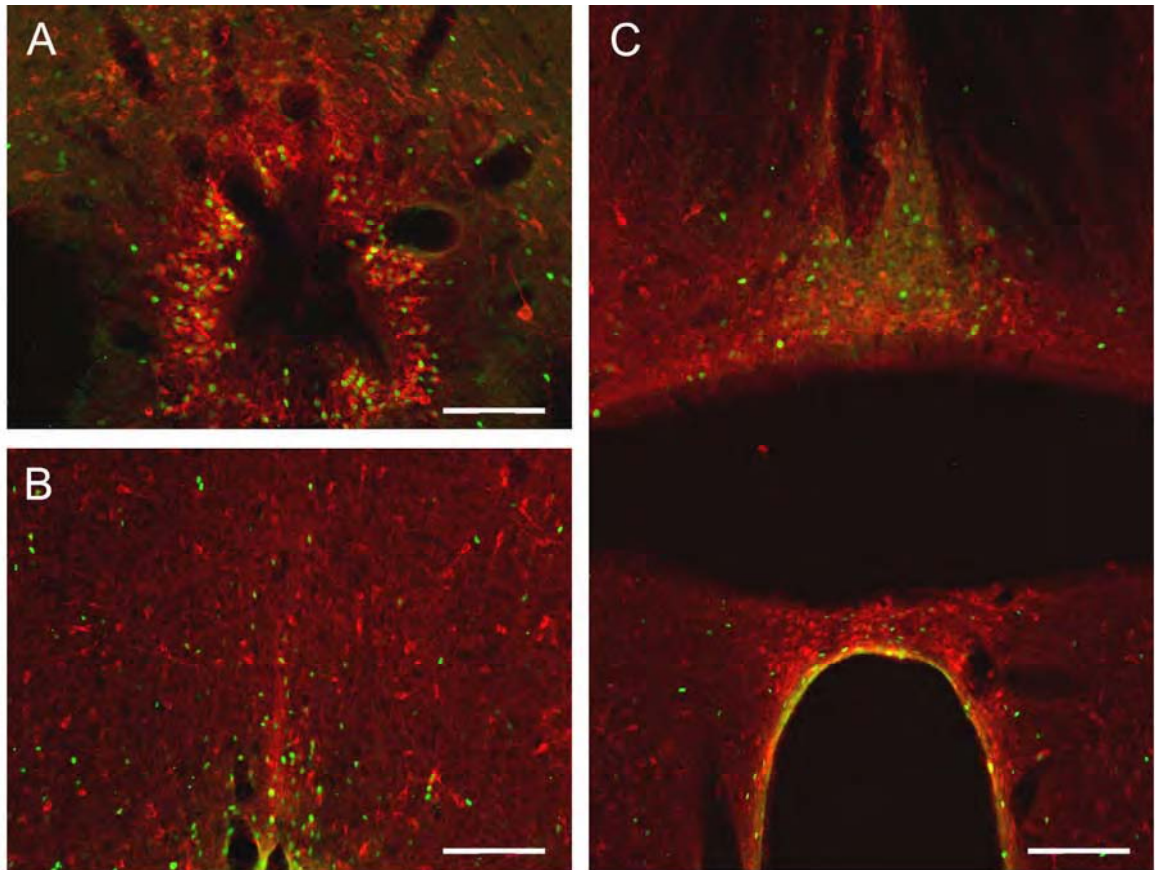


Abb. 50: Darstellung der nNOS/Fos-positiven Neurone in den Substrukturen des MnPO und OVLT nach PEG-induzierter Hypovolämie (Gruppe C)

Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone erfolgte im immunhistochemischen Schnitt mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und *polyclonal rabbit anti-Fos* (1:1000) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene nNOS und Fos. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1:800) stellte sich die nNOS als zytoplasmatisches, rotes Signal dar. Zur Visualisierung des nukleär translozierten Fos-Proteins wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwandt (*biotin-goat-anti-rabbit IgG*; 1:200), der durch an Biotin bindendes *Fluorescein-Avidin D* (1:300) detektiert werden konnte und sich somit im immunhistologischen Bild als nukleäres, grünes Signal darstellte.

(A) OVLT (B) aMnPO (C) dMnPO & vMnPO

Balken entspricht 100 μ m

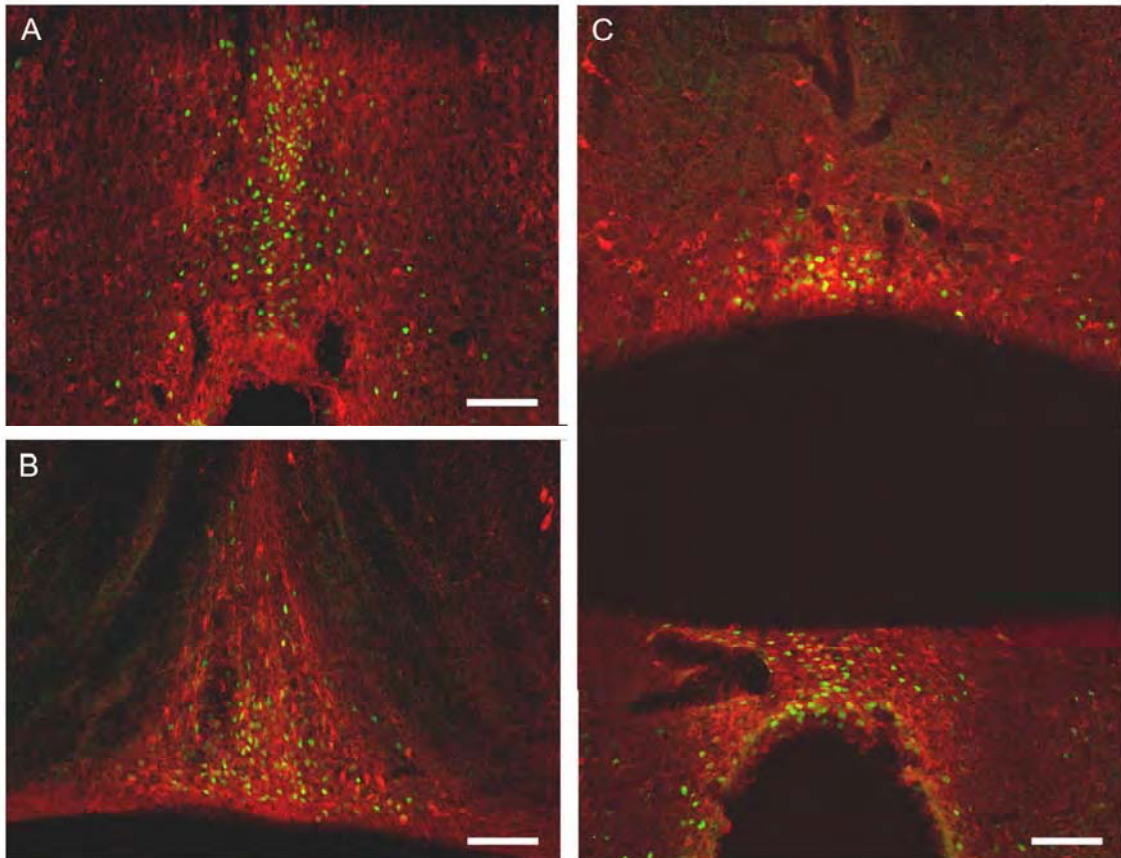


Abb. 51: Darstellung der nNOS/Fos-positiven Neurone in den Substrukturen des MnPO nach 24-stündiger Dehydrierung (Gruppe D)

Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone erfolgte im immunhistochemischen Schnitt mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und *polyclonal rabbit anti-Fos* (1:1000) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene nNOS und Fos. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1:800) stellt sich die nNOS als zytoplasmatisches, rotes Signal dar. Zur Visualisierung des nukleär translozierten Fos-Proteins wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwandt (*biotin-goat-anti-rabbit IgG*; 1:200), der durch an Biotin bindendes *Fluorescein-Avidin D* (1:300) detektiert werden konnte und sich somit im immunhistologischen Bild als nukleäres, grünes Signal darstellte.

(A) OVLT / aMnPO (B) dMnPO (C) dMnPO & vMnPO Balken entspricht 100 µm

3.2.4. Aktivierung (nicht-)nitrerger Neurone im *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT)

Das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) als neurogliale Struktur außerhalb der BHS in unmittelbarer Nachbarschaft zum MnPO wurde hinsichtlich der Stimulations-bedingten Aktivierung nitrerger Neurone ebenfalls immunhistochemisch aufgearbeitet.

3.2.4.1. Verteilung und Quantifizierung nukleärer Fos-Signale

Unter den euthermen, euhydrierten Versuchsbedingungen der Kontrollgruppe zeigten $17,4 \pm 5,4$ Zellen pro 40 μm Gehirnschnitt auf der Ebene des OVLT ein

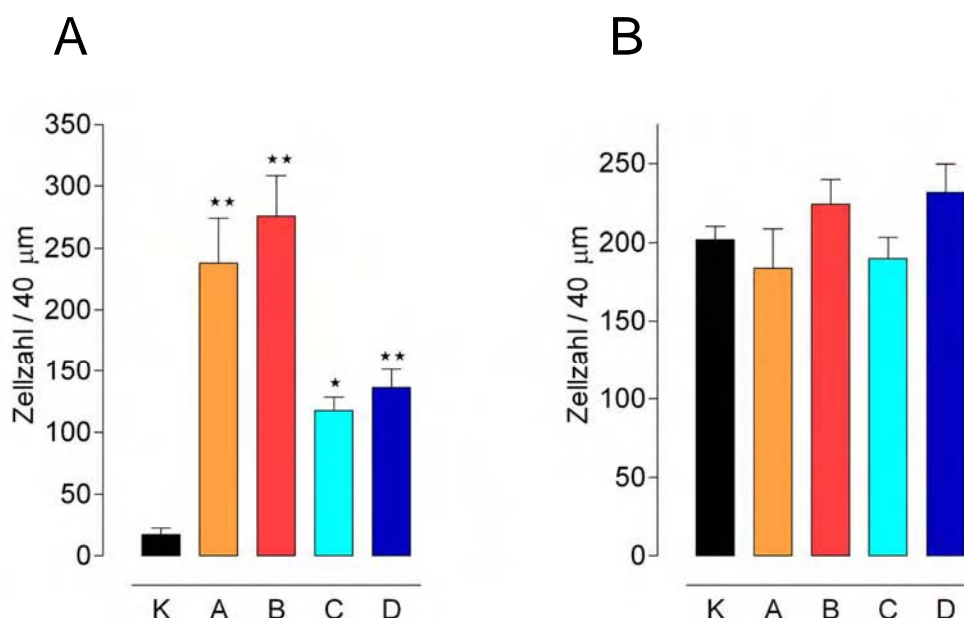


Abb. 52: Anzahl Fos-positiver bzw. nNOS-positiver Neurone im OVLT nach milder Wärmeexposition, Hitzestress, Hypovolämie und Dehydrierung

Für jedes Versuchstier wurde die aus mehreren ($n \geq 3$) Gewebsschnitten (40 μm) arithmetisch bestimmte Zellzahl/Schnitt Fos-positiver Neurone (= deren Zellkerne) (**A**) bzw. nNOS-positiver Neurone (= Cytosol) (**B**) im Bereich des OVLT bestimmt. Aus diesen wurde die gemittelte Zellzahl für jede Versuchstiergruppe erhoben und die daraus resultierenden Mittelwerte mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (* $2p \leq 0,05$; ** $2p \leq 0,01$) ($n=5$).

| | | |
|-------------|-----|--|
| Schwarz: | (K) | Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser <i>ad lib</i> . |
| Orange: | (A) | Milde Wärmeexposition; 48 h bei 30°C RT, Wasser <i>ad lib</i> . |
| Rot: | (B) | Hitzestress; 48 h bei 33°C RT, Wasser <i>ad libitum</i> |
| Hellblau: | (C) | Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT |
| Dunkelblau: | (D) | Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT |

nukleäres Fos-Signal (Abb. 52 A). Die ermittelten Zellzahlen für die Gruppen A, B und D erwiesen sich als hoch signifikant ($2p \leq 0,01$), die der Gruppe C als signifikant ($2p \leq 0,05$) höher als diejenige der Kontrolltiere. So zeigten sich nach Wärmeexposition bzw. Hitzestress der Gruppen A bzw. B mittlere Zahlen Fos-immunopositiver Zellen von $238,0 \pm 36$ Zellen bzw. $275,8 \pm 32,6$ pro Gewebsschnitt. Induziert durch Hypovolämie bzw. Dehydrierung ergaben sich $117,5 \pm 10,9$ Fos-immunopositive Zellen pro $40 \mu\text{m}$ Gewebsschnitt für Versuchsgruppe C und $136,2 \pm 15,1$ Zellen pro $40 \mu\text{m}$ Schnitt auf Ebene des OVLT für Versuchsgruppe D (Abb. 52 A).

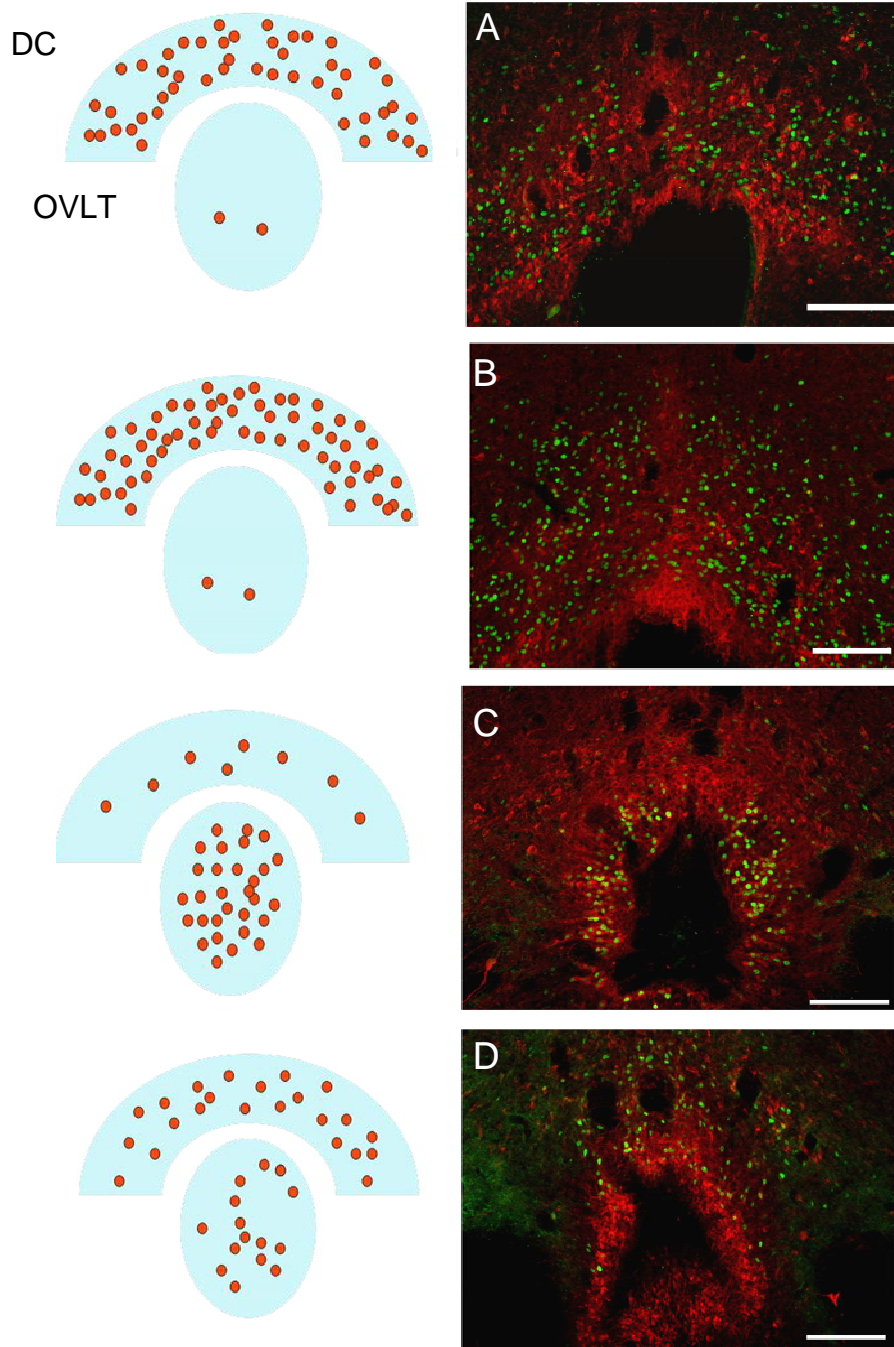
Um eine Aussage über verschiedene Verteilungsmuster der neuronalen Aktivierung im OVLT treffen zu können, wurde das OVLT in zwei Substrukturen unterteilt. Hierbei handelte es sich um den zentralen Anteil des OVLT mit parenchymatöser und vaskulärer Subkomponente, sowie die dorsal aufliegende, halb-kreisförmige *dorsal cap*. Es war zu beobachten, dass im Rahmen der Stimulation der Gruppen A und B fast ausschließlich eine Aktivierung dieser *dorsal cap* zu erkennen war, welche bei Versuchsgruppe B intensiver als bei Versuchsgruppe A immunmarkiert war (Abb. 53). Nach 24-stündigem Wasserentzug (Versuchsgruppe D) konnte eine homogene Verteilung der Fos-positiven Neurone über beide Substrukturen bei insgesamt geringerer Dichte im Ver-

Abb. 53: Vergleichende Darstellung der Verteilung Fos-positiver (nicht-)nitrerger Neurone im OVLT bei den Versuchsgruppen A - D

Rechts Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone erfolgte im immunhistochemischen Schnitt mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und *polyclonal rabbit anti-Fos* (1:1000) binden mit ihren F(ab)-Fragmenten an die Epitope der Antigene nNOS und Fos. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1:800) stellte sich die nNOS als zytoplasmatisches, rotes Signal dar. Zur Visualisierung des nukleären Fos-Proteins wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwandt (*biotin-goat-anti-rabbit IgG*; 1:200), der durch an Biotin bindendes *Fluorescein-Avidin D* (1:300) detektiert werden konnte und sich somit im immunhistologischen Bild als nukleäres, grünes Signal darstellte.

Links: Schematisierte Verteilung Fos-positiver Zellen in den Substrukturen des OVLT. DC: "dorsal cap"; OVLT: Zentrale vaskuläre Komponente des *Organum vasculosum laminae terminalis*

Balken entspricht $100 \mu\text{m}$



gleich zu den thermischen Stimulationen beobachtet werden (Abb. 52 A und 53). Die durch PEG-Applikation hervorgerufene isotone, intravasale Hypovolämie der Versuchsgruppe C resultierte in einer markanten Aktivierung von Zellen im Bereich des zentralen Anteils des OVLT, bei vernachlässigbarer Fos Translokation in der *dorsal cap* Region (Abb. 53). Eine nähere Unterscheidung des zentralen OVLT in die beiden Subkomponenten wurde nicht vorgenommen.

3.2.4.2 Aktivierung nitrerger OVLT-Neurone

Parellel zu den experimentellen Studien am MnPO der Ratte wurde auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen auf der Ebene des OVLT der Frage nachgegangen, inwieweit es zu einer Aktivierung nitrerger Neurone kam. Betrachtet man die Zahl nNOS-immunopositiver OVLT-Neurone, so zeigte sich wie für den MnPO eine stimulations-unabhängige Expression des Enzyms zumindest die reine Anzahl der Neurone betreffend. Die für die verschiedenen Versuchsgruppen erhobenen und gemittelten Zahlen nNOS-positiver Zellen schwankten zwischen $189,7 \pm 13,8$ und $231,5 \pm 18,2$ (Abb. 52 B). Im Falle der Kontrollgruppe sowie der beiden Wärme bzw.

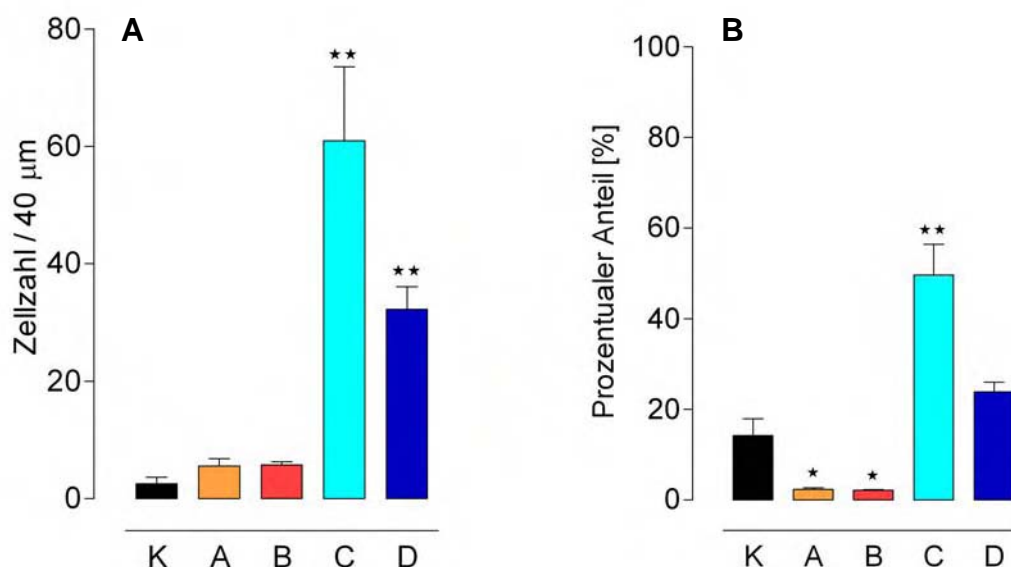


Abb. 54: Anzahl und prozentualer Anteil nNOS / Fos-positiver Neurone im OVLT nach milder Wärmeexposition, Hitzestress, Hypovolämie und Dehydrierung

Für jedes Versuchstier wurde die aus mehreren ($n \geq 3$) Gewebsschnitten ($40 \mu\text{m}$) arithmetisch bestimmte Zellzahl der nNOS/Fos-positiven Neurone im OVLT bestimmt. Aus dieser wurde die mittlere Zellzahl für jede Versuchstiergruppe erhoben und die daraus resultierenden Mittelwerte mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt (**A**). Darüber hinaus wurde der prozentuale Anteil der nNOS/Fos-positiven Neurone an der Gesamtzahl Fos-positiven Neurone im OVLT bestimmt (**B**). Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (* $2p \leq 0,05$; ** $2p \leq 0,01$) ($n=5$).

| | | |
|-------------|-----|---|
| Schwarz: | (K) | Kontrollgruppe – thermoneutral (23°C RT), Wasser <i>ad lib</i> . |
| Orange: | (A) | Milde Wärmeexposition; 48h bei 30°C RT, Wasser <i>ad lib</i> . |
| Rot: | (B) | Hitzestress; 48h bei 33°C RT, Wasser <i>ad libitum</i> |
| Hellblau: | (C) | Isotone Hypovolämie; PEG i.p., 23°C RT |
| Dunkelblau: | (D) | Dehydrierung; 24 h Trinkwasserentzug, 23°C RT |

Hitze exponierten Versuchsgruppen B bzw. C konnten in lediglich 2 – 6 Neuronen ein kombinierter immunhistochemischer Nachweis für die nukleäre Fos Translokation in nitrergen Neuronen erbracht werden, wobei sich eine marginale Erhöhung für die Versuchsgruppen A und B im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab (Abb. 54 A). Bezogen auf die Gesamtanzahl Fos-immunpositiver Zellen ergab dies $2,3 \pm 0,4 \%$ bzw. $2,1 \pm 0,1 \%$ (Abb. 54 B). Anders stellte sich die Aktivierung nitrerger OVLT-Neurone in den Versuchsgruppen C und D dar. Vor allem die durch PEG Behandlung induzierte isotone intravasale Hypovolämie führte zu einer ausgeprägten Aktivierung nitrerger Zellen mit Werten von $60,9 \pm 12,7$ pro $40 \mu\text{m}$ Gewebsschnitt, welches einem prozentualen Anteil von $49,6 \pm 6,8 \%$ aller Fos-immun-positiven (Abb. 54) sowie etwa 30 % aller nitrergen Zellen entspricht. Dehydrierung ihrerseits induzierte Fos-Translokation in $32,3 \pm 3,8$ OVLT-Zellen, gleichbedeutend $23,9 \pm 2,1 \%$ aller Fos-immunpositiven sowie ca. 15 % aller nitrerger OVLT-Neurone (Abb. 54).

3.3. Retrogrades, neuronales Tracing afferenter, monosynaptischer Verbindungen zum pPVN

3.3.1. (Extra)hypothalamische neurogliale Strukturen mit efferenter Projektion zum pPVN

Zur retrograden Markierung (extra-)hypothalamischer Neuronenpopulationen, deren Axone efferent Neurone des parvozellulären PVN (pPVN) innervieren, erfolgte die stereotaktische Mikroapplikation des neuronalen Tracers true blue (TB) in den Bereich des pPVN. In Abb. 55 werden einige Injektionsstellen nach Mikroapplikation (30 nl) des retrograden Tracers TB im Bereich des PVN coronaler Gewebeschnitte ($40 \mu\text{m}$) des Rattengehirns dargestellt. Der in Abb. 55 A gezeigte Locus der Mikroapplikation sowie die räumliche Ausdehnung des Injektionsvolumens entsprachen den gewünschten Anforderungen für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien, mit exakter Lokalisation des Tracers im Areal des parvozellulären, periventrikulären PVN. In Abb. 55 C / D erfolgte die Tracerinjektion in die magnozellanuläre Komponente des PVN (mPVN) bei zusätzlich zu großflächiger Diffusion von TB. In den Teilabbildungen 55 E / F wurde der Tracer (weit) außerhalb des PVN deponiert, so dass diese Versuche gleichsam als Kontrolle für diejenigen mit exakter Mikroapplikation in den pPVN herangezogen werden konnten.

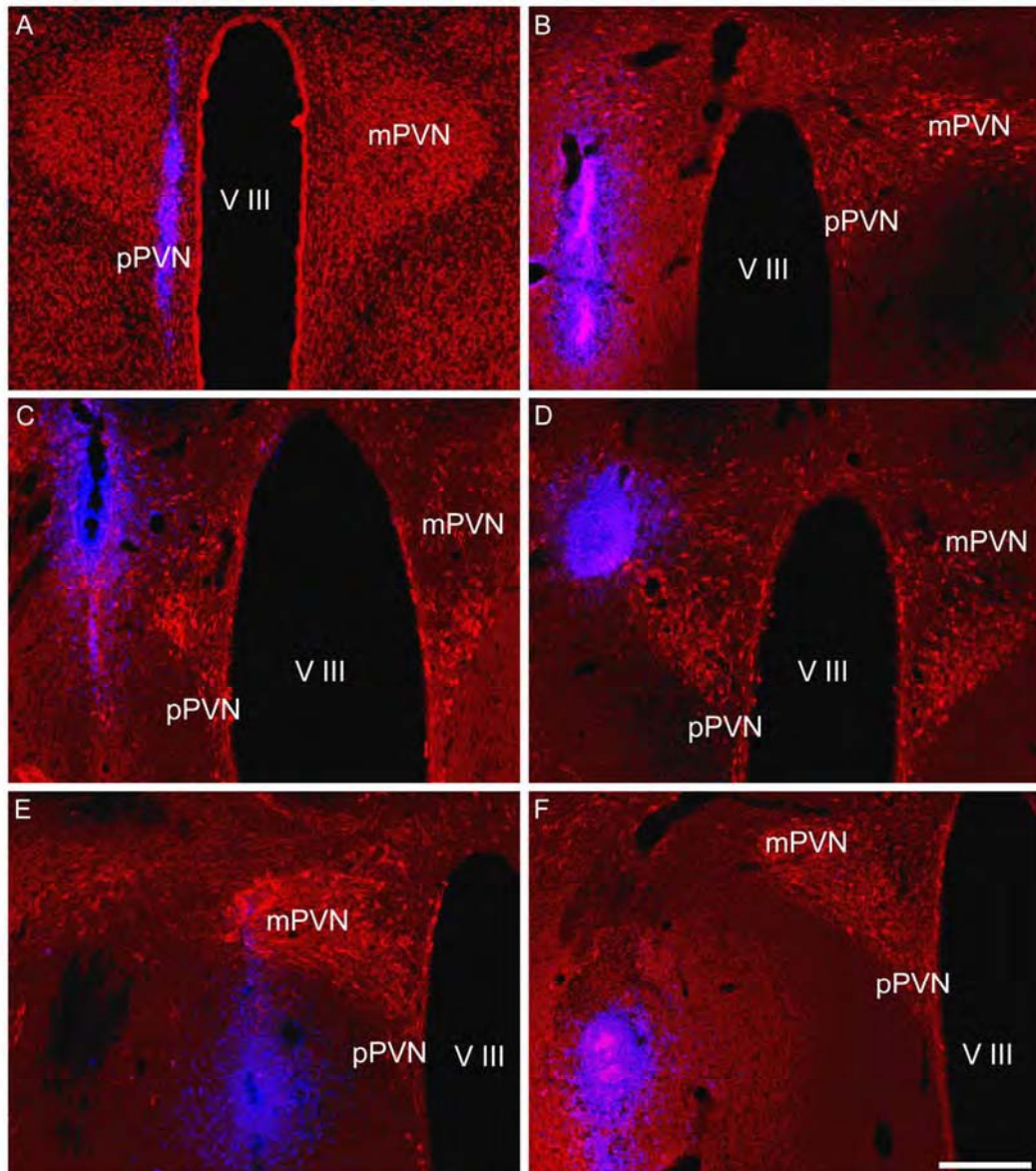


Abb. 55: Mikroapplikation des retrograden Tracers true blue in den parvocellulären PVN (pPVN) des Hypothalamus

Darstellung einzelner Beispiele für die Mikroinjektion von 30 nl true blue in den Bereich des pPVN narkotisierter, adulter Ratten (blau – lila). Zur Verdeutlichung der neuroglialen Substrukturen des *Nucleus paraventricularis* (PVM) erfolgte die immunhistochemische Markierung PVN-intrinsischer, nNOS-positiver Neurone (rot) mit Hilfe des Primärantikörpers *monoclonal mouse anti-nNOS* (1:500) und des Sekundärantikörpers *Cy3-donkey-anti-mouse IgG* (1:800).

(A) Exakte Injektion in den parvocellulären Anteil des PVN; (B) Fehlinjektion in die periventriculäre Zone; (C,D) Injektion in den magnocellulären Anteil des PVN; (E,F) Fehlinjektionen in die laterale präoptische Region.

mPVN: magnocellulärer Anteil des *N. paraventricularis hypothalami*; pPVN: parvocellulärer Anteil des *N. paraventricularis hypothalami*; V III: dritter Hirnventrikel

Balken entspricht 100 µm

Bezogen auf den MnPO zeigte sich bei allen 5 Tieren mit erfolgreicher Tracer-Mikroapplikation direkt in den pPVN für den aMnPO ipsilateral eine mittlere Dichte markierter Neurone, während contralateral nur eine geringe Zahl TB-positiver Neurone dokumentiert werden konnte (Abb. 61). Im Bereich der weiteren zwei Substrukturen des MnPO (dMnPO / vMnPO) konnte bei mittelstarker Markierung keine Unterscheidung zwischen einer ipsi- und kontralateralen Ausprägung TB-positiver Neurone festgestellt werden.

Nach Mikroinjektion von „true blue“ (TB) in den pPVN konnten neben den distinkten Zellpopulationen im MnPO zahlreiche weitere hypothalamische (Abb. 57) sowie extrahypothalamische (Abb. 58), neurogliale Strukturen mit direkter Projektion in den Bereich des pPVN unterschieden werden. Zur genaueren neuroanatomischen Lokalisation der mit TB markierten Neuronengruppen im Hypothalamus wurde dieser in jeweils eine periventrikuläre, mediale und laterale Zone eingeteilt. Mit Hilfe einer semiquantitativen Erfassung wurde zusätzlich zur Lokalisation der markierten Neurone eine Beurteilung der Markierungsdichte vorgenommen. Diese erfolgte anhand einer Skala mit einer Einteilung in:

- +++ = hoher Dichte an TB-positiven Neuronen
- ++ = mittlerer Dichte an TB-positiven Neuronen
- + = geringer Dichte an TB-positiven Neuronen
- = kein Nachweis TB-positiver Neurone

Im Bezug zur Injektionsstelle im Bereich des linken pPVN wurde zudem zwischen einer ipsi- und kontralateraler Ausprägung der Markierung unterschieden (Tab. 2 und 3).

Innerhalb der periventrikulären Zone des Hypothalamus konnten neben dem MnPO im wesentlichen drei weitere Kerngebiete mit direkter Projektion zum pPVN identifiziert werden. Die höchste Dichte true blue markierter Neurone wurde im Bereich des linken *Nucleus suprachiasmaticus* (SCh) identifiziert, bei gleichzeitiger Markierung weniger Neurone auf der kontralateralen Seite. Auch die anteriore, parvozelluläre Komponente des PVN (PaAP) wies zahlreiche in den pPVN projizierende Neurone auf (Tab. 2). Des Weiteren konnten TB-positive, magnozellanuläre Neurone im *Nucleus supraopticus* (SON) dargestellt wer-

den, der zudem lediglich eine ipsilaterale Ausprägung der Markierung aufwies (Tab. 2; Abb. 57).

Ein Großteil der medialen Zone des Hypothalamus wird von der medialen präoptischen Region (MPA) eingenommen, die aus der undifferenzierten grauen Substanz und fünf ausgeprägten Kerngebieten besteht. Insgesamt zeigte sich eine relativ homogen verteilte, markante Dichte an true blue markierten Ner-

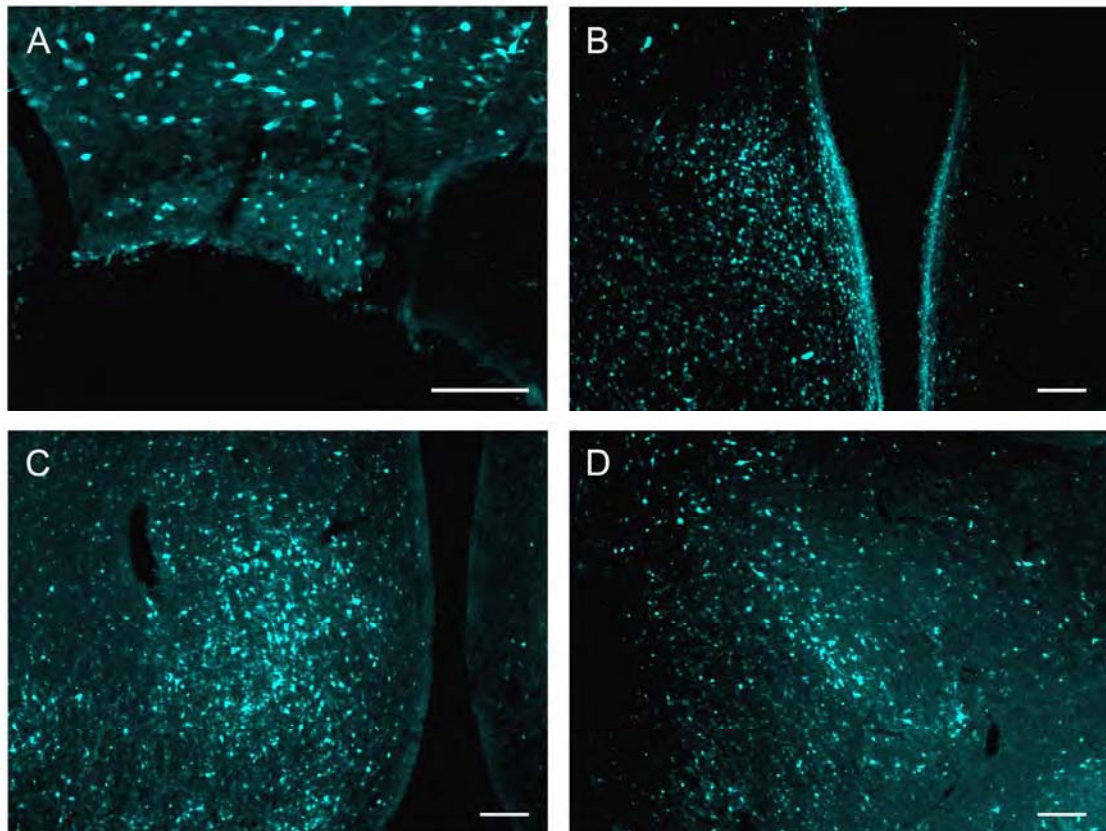


Abb. 57: Retrograde Markierung hypothalamischer Kerngebiete nach TB Mikroapplikation in den pPVN

Als neuronaler Tracer wird true blue (TB) von synaptischen Endigungen im pPVN aufgenommen und retrograd in die dazugehörigen Zellkörper transportiert; TB stellt sich mikroskopisch als zytoplasmatisches, blaues Signal dar. Neben dem MnPO konnte TB in Neuronen zahlreicher hypothalamischer Kerngebiete meist begrenzt auf der zur Applikation ipsilateralen Seite nachgewiesen werden.

(A) *Nucleus supraopticus* (SON), (B) periventrikulärer Nucleus des Thalamus (PVA), (C) mediale präoptische Region (MPA), (D) laterale präoptische Region (LPO).

Balken entspricht 100 µm

venzellen, die grundsätzlich nur ipsilateral ausgeprägt war (Tab. 2; Abb. 57). Als ovale Struktur stellte sich der *Nucleus praeopticus medialis* (MPO) dar, der sich in seiner Gesamtheit über die ganze longitudinale Ausbreitung der MPA erstreckt. In seinen insgesamt drei zu differenzierenden Substrukturen, einem zellarmen lateralen (MPOL), einem zellreichen medialen (MPOM) und einem sehr zellreichen zentralen Anteil (MPOC), konnte eine hohe Dichte TB-markierter Neurone detektiert werden (Tab. 2). Neben diesen prominenten Neuronenpopulationen wiesen sich auch der ventromediale und -laterale präoptische Nucleus (VMPO / VLPO) als retrograd markierte Kerngebiete aus, bei ebenfalls lediglich ipsilateraler Ausprägung der Markierung (Tab. 2).

| Hypothalamische Projektionsgebiete | Ipsilaterale Ausprägung | Contralaterale Ausprägung |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Periventrikuläre Zone | | |
| MnPO | ++ | + |
| PaAP | +++ | + |
| SCh | +++ | - |
| SON | + | - |
| Mediale Zone | | |
| MPA | +++ | - |
| MPOC | +++ | - |
| MPOL | +++ | - |
| MPOM | +++ | - |
| VLPO | +++ | - |
| VMPO | ++ | - |
| Laterale Zone | | |
| LA | + | - |
| LHA | +++ | + |
| LPO | ++ | - |
| MCPO | +++ | - |

Tab. 2: Hypothalamische Kerngebiete mit efferenter Projektion zum pPVN

Die Mikroapplikation des retrograden Tracers true blue (TB) in den parvozellulären *Nucleus paraventricularis hypothalami* (pPVN) führte zur Markierung zahlreicher hypothalamischer Kerngebiete.

Die laterale Zone des Hypothalamus wird funktionell in zwei Untereinheiten eingeteilt, die laterale präoptische Region (LPO) und das laterale hypothalamische Areal (LHA). Die LPO ist durch mittelgroße Neurone gekennzeichnet, die sich um den dorsomedialen Anteil des mittleren Vorderhirnbündels formieren und dorsal vom Kerngebiet der *Stria terminalis* und der *Substantia innominata* begrenzt werden. Innerhalb dieses Gebietes konnte ein homogenes Muster true blue markierter Neurone hoher Dichte dargestellt werden. Als einzig ausgeprägtes Kerngebiet der LPO ist der magnozelluläre, präoptische Nucleus zu nennen, dessen Neurone eine massive TB Markierung zeigten (Abb. 56; Tab. 2). Wie für die LPO konnte auch in der LHA eine weite Verbreitung und hohe Dichte TB markierter Neurone nachgewiesen werden, wobei eine begrenzte Anzahl TB positiver Nervenzellen auch auf der kontralateralen Hirnhälfte markiert waren. Es konnten zudem Neurone im Bereich des anterioren hypothalamischen Nucleus (LA) identifiziert werden.

Zusätzlich zu den hypothalamischen konnten extrahypothalamische Neuronenpopulationen mit efferenten Projektionen zum pPVN erfasst werden. Es sind solche corticalen Ursprungs aus Bereichen des Limbischen Systems (*Septum*, *Amygdala*, Kerngebiet der *Stria terminalis*) sowie aus Thalamus, Hirnstamm und der Gruppe der CVOs zu unterscheiden.

Als stärkst markiertes Gebiet im Cortex ist das *Cingulum* zu nennen. Zum präfrontalen Cortex gehörend wird dieses in drei Areale (Cg 1-3) eingeteilt. Alle drei Anteile wiesen ipsilateral eine hohe Dichte TB markierter Neurone auf, bei geringfügiger Lokalisation auch auf der kontralateralen Seite. Eine kleine Anzahl markierter Neurone konnte im piriformen Cortex, vor allem im Bereich des *Nucleus endopiriformis dorsalis* (DeN) nachgewiesen werden. Im Limbischen System war eine besonders intensive Ansammlung retrograd markierter Zellen in den Anteilen des *Septum* zu beobachten. Als wichtiger Anteil des limbischen Systems ist es unterhalb des *Corpus callosum*, zwischen den anterioren Hörnern der Lateralventrikel und oberhalb der Mittellinie der *Commissura anterior* gelegen. Aufgrund zytoarchitektonischer und topographischer Beschaffen-

| Extrahypothalamische Projektionsgebiete | Ipsilaterale Ausprägung | Contralaterale Ausprägung |
|---|-------------------------|---------------------------|
| Kortikale Gebiete | | |
| Cingulate cortex 1-3 | +++ | + |
| Cortex piriformis | + | - |
| Den | ++ | - |
| Septum | | |
| HDB | +++ | + |
| LSI | +++ | - |
| LSV | +++ | - |
| MS | ++ | ++ |
| SHy | +++ | - |
| TS | ++ | - |
| VDB | +++ | ++ |
| Amygdala | | |
| AcbSH | ++ | - |
| MeAD | ++ | - |
| STMA | +++ | - |
| STMAL | +++ | - |
| STMLV | +++ | - |
| STMPI | + | - |
| STMPL | + | - |
| STMPM | ++ | - |
| STMV | +++ | - |
| CVOs | | |
| OVL | +++ | + |
| SFO | + | - |
| Thalamus | | |
| PVA | ++ | + |
| Hirnstamm | | |
| AP | ++ | - |
| NTS | ++ | + |

Tab. 3: Extrahypothalamische Kerngebiete mit efferenter Projektion zum pPVN

Die Mikroapplikation des retrograden Tracers true blue (TB) in den parvozellulären *Nucleus paraventricularis hypothalami* (pPVN) führte zur Markierung zahlreicher extrahypothalamischer Regionen.

heiten unterscheidet man einen medialen, lateralen und posterioren Anteil. Dem *Septum laterale* zuzuordnen, stellten sich dessen dorsale (LSD), ventrale (LSV) und intermediäre (LSI) Komponenten als stark markierte Areale dar, die ausschließlich eine ipsilaterale Ausprägung true blue positiver Neurone aufwiesen (Abb. 58; Tab. 3). Der mediale Anteil setzt sich aus dem dorsal gelegenen *Nucleus septalis medialis* (MS) und dem ventral gelegenen Nucleus des diagonalen Bandes von Broca zusammen, welcher sich wiederum in einen vertikalen (VDB) und einen horizontalen Schenkel (HDB) teilt. Während der MS eine sowohl ipsi- als auch kontralateral mäßige Ausprägung TB positiver Neurone aufwies, wurde das diagonale Band in beiden Teilen ipsi- und kontralateral stark markiert. Vergleichbar intensive Projektionsgebiete ließen sich in den Bereichen der Amygdala dokumentieren. Besonders hervorzuheben ist die massive Markierung sämtlicher Anteile des basalen Kerngebietes der *Stria terminalis*, des medialen amygdaloiden Nucleus (MeAD) und des *Nucleus accumbens* (Acb). Auffällig erscheint, dass true blue markierte Neurone ausschließlich ipsilateral zu finden waren.

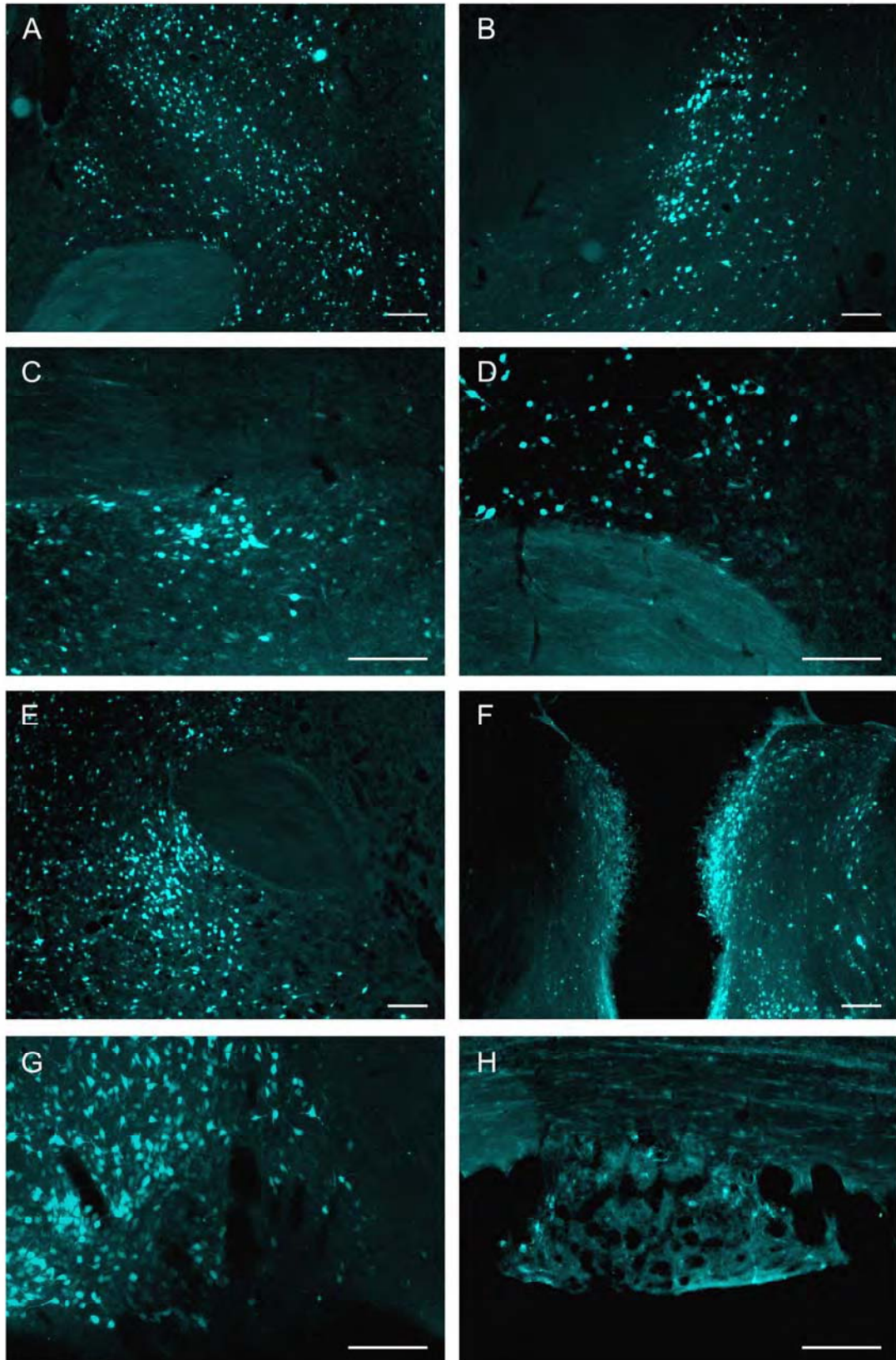
Im Thalamus wies der paraventriculäre Nucleus (PVA) eine deutlich ipsilaterale Ansammlung TB positiver Neurone auf, bei schwächerer Markierung der kontralateralen Seite (Tab. 3).

Abb. 58: Retrograde Markierung extrahypothalamischer Kerngebiete und der CVOs durch den Tracer TB nach Mikroapplikation in den pPVN

Der neuronale Tracer true blue (TB) wird mittels retrogradem, axonalen Transport in die Perykaria der zugehörigen Neurone transportiert und stellt sich als zytoplasmatisches, blaues Signal dar. Die Bildtafel zeigt eine Auswahl retrograd markierter extrahypothalamischer Kerngebiete und CVOs

(A) laterales Septum, (B) horizontales Band von Broca, (C) Kerngebiet der *Stria terminalis* (medial, latero-ventral)(STMLV), (D) Kerngebiet der *Stria terminalis* (medial, anterior) (STMA), (E) Kerngebiet der *Stria terminalis* (medial, ventral) (STMV) (F) paraventriculärer Nucleus des Thalamus, (G) OVLT, (H) SFO

Balken entspricht 100 µm



Unter den circumventrikulären Organen zeigt sich die stärkste Markierung im Bereich des OVLT, welches eine deutlich ipsilaterale Ausprägung der TB-Markierung zeigte, während im Subfornikalorgan lediglich eine geringe Zahl TB positiver Neurone zu finden war (Tab. 3). Die am weitesten caudal gelegenen Markierungen zeigten sich in der im Hirnstamm befindlichen *Area postrema* (AP) sowie dem *Nucleus tractus solitarius* (NTS), welches klar auf eine monosynaptische Verbindung vom NTS zum pPVN hinweist (Tab. 3).

3.3.2. Immunhistochemische Charakterisierung getracter Neurone in MnPO und OVLT nach osmotischer Stimulation

In Kap. 3.2.3.1 / 3.2.3.2 konnte gezeigt werden, dass unter den Bedingungen einer milden Dehydrierung der Versuchstiere je nach Substruktur des MnPO 12 - 25 %, der aktivierten Neurone mit nachweislich nukleärer Fos-Translokation der Gruppe der nitrergen Neurone zuzuordnen waren. Bedingungen einer isotonen, intravasalen Hypovolämie bedingten eine demgegenüber reduzierte Aktivierung nitrerger Neurone, und die milde Wärmeexposition vermochte es nicht, nNOS exprimierende Zellen des MnPO zu stimulieren. Aufgrund dieser immunhistochemischen Ergebnisse physiologischer Versuche sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch extrazelluläre Dehydrierung aktivierte Neuronenpopulationen des MnPO efferente Konnektivitäten zum pPVN als wichtigstem „Integrator“ autonomer Regelkreise auf hypothalamischer Ebene aufweisen.

Folgerichtig wurde bei fünf Tieren, wie in Kapitel Kap. 2.4.4.1 beschrieben, true blue als retrograder, neuronaler Tracer stereotaktisch in den pPVN mikroapplied, und diese Tiere den Stimulationsbedingungen der Versuchsgruppe D (Kap. 2.4.2) unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte eine immunhistochemische Charakterisierung wie in Kap. 2.4.5 beschrieben, kombiniert mit dem Fluoreszenznachweis für transportiertes TB.

3.3.2.1. Anteriorer *Nucleus praeopticus medianus* (aMnPO)

In der anterioren Substruktur des MnPO bewirkte der 24-stündige Trinkwasserentzug bei den fünf mit TB mikroinjizierten Tieren eine Fos-Induktion in $19,7 \pm 0,9$ nitrergen Zellen/ 40 μm Gehirnschnitt (Abb. 59), entsprechend einem Anteil von 25,1 % aller Fos-positiven Neurone des aMnPO (Abb. 59). Von diesen nNOS- sowie Fos-positiven Neuronen wiesen 19,3 % eine Markierung durch

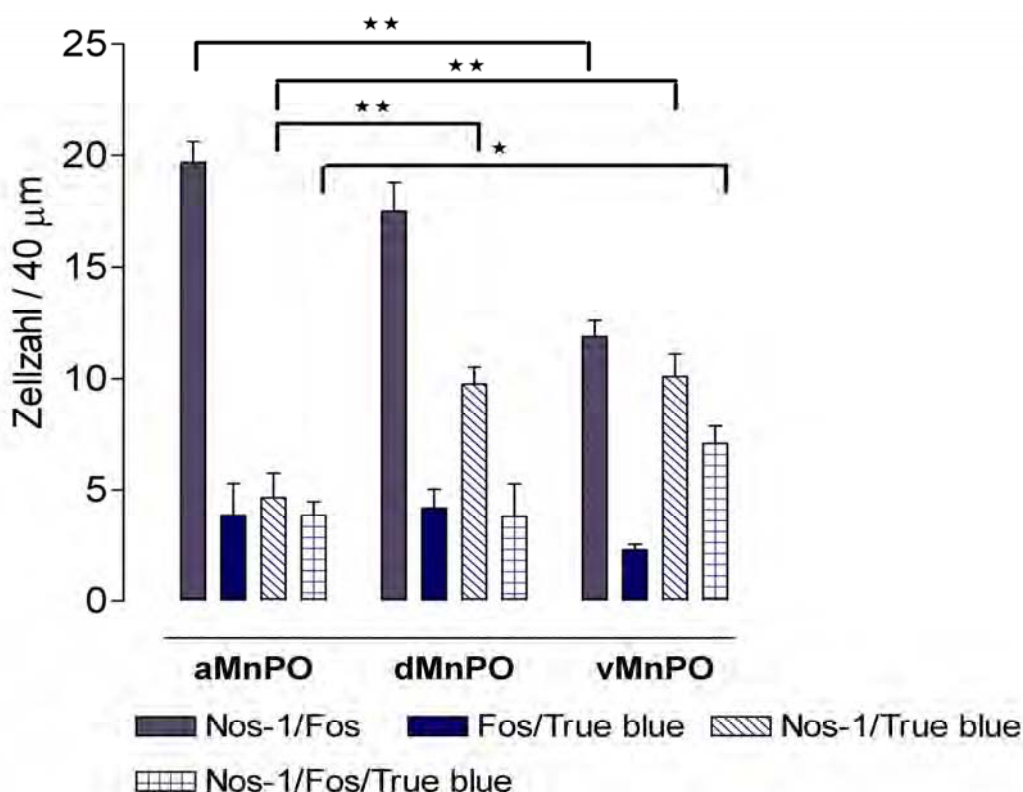


Abb. 59: Darstellung der Mehrfachmarkierungen der Neurone in den Substrukturen des MnPO nach Mikroinjektion des neuronalen Tracers TB in den pPVN und osmotischer Stimulation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden einer Mikroapplikation des retrograden Tracers true blue (TB) in den Bereich des parvozellulären *Nucleus paraventricularis* (pPVN) sowie nach Rekonvaleszenz einem 24-stündigen Entzug des Trinkwassers unterzogen. Immunhistochemisch (Fos, nNOS) und durch Fluoreszenz-Analyse (TB) erfolgte in coronalen Gehirnschnitten für jedes Versuchstier in den drei Substrukturen des MnPO die Bestimmung der aus $n \geq 3$ coronalen Gehirnschnitten gemittelten Anzahlen an Zellen mit (1) nNOS / Fos, (2) Fos / TB, (3). nNOS / TB sowie (4) nNOS / Fos / TB positiven Neuronen. Die daraus resultierenden Mittelwerte wurden jeweils mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt. Durch Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (* $2p \leq 0,05$; ** $2p \leq 0,01$) ($n = 5$).

den retrograden Tracer true blue auf. Durchschnittlich $4,6 \pm 1,1$ Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt zeigten eine Co-Lokalisation von nNOS und TB, während $3,8 \pm 1,4$ Fos-positive, jedoch nNOS-negative Zellen/ $40 \mu\text{m}$ Gehirnschnitt in den pPVN projizierten, was einem prozentualen Anteil von 4,8 % entsprach (Abb. 59). Gemessen an der Gesamtzahl der TB-positiven Neurone von durchschnittlich $51,7 \pm 3,0$ Zellen/ $40 \mu\text{m}$ wiesen 7,4 % eine Co-Lokalisation mit Fos, 8,9 % einen Nachweis von nNOS und 7,3 % eine Dreifachmarkierung auf (Abb. 60, 61).

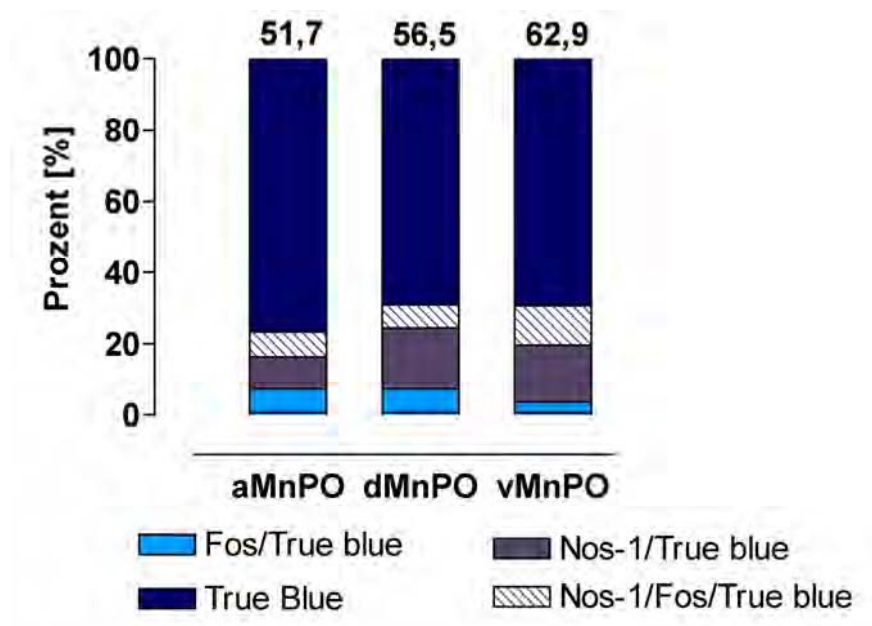


Abb. 60: Prozentuale Verteilung der Mehrfachmarkierungen getracter Neurone

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Mehrfachmarkierungen getracter Neurone. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der true blue positiven Neurone der jeweiligen Substruktur des MnPO an.

aMnPO: anteriore Komponente, dMnPO: dorsale Komponente, vMnPO: ventrale Komponente des MnPO

3.3.2.2. Dorsaler Nucleus praeopticus medianus (dMnPO)

Bedingt durch die osmotische Stimulation der Versuchstiere erwiesen sich $17,5 \pm 1,3$ dMnPO-Neurone als nNOS / Fos immunopositiv, entsprechend 20,2 % aller Fos-positiven Neurone (Abb. 59). Im Mittel $3,8 \pm 1,4$ Zellen/ $40 \mu\text{m}$

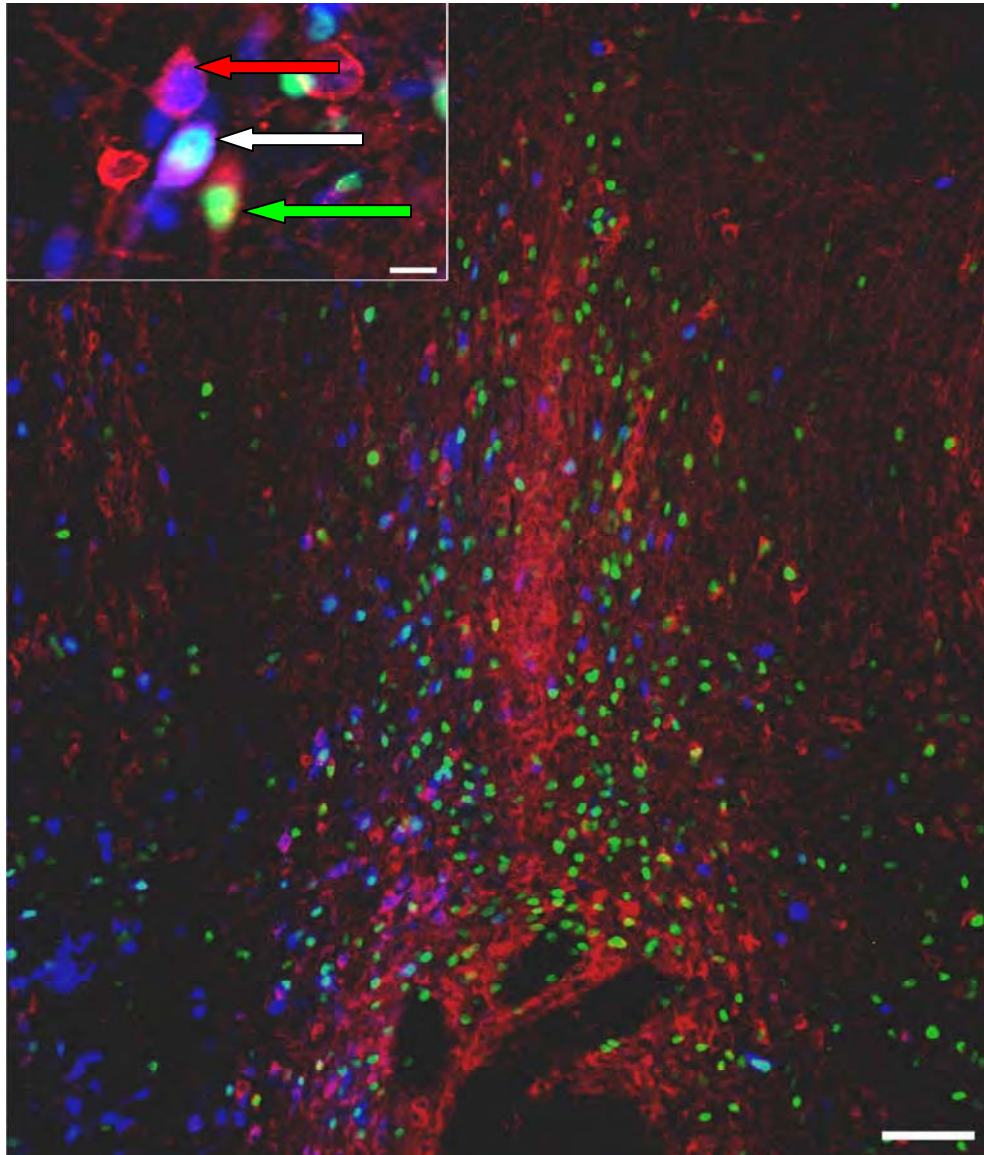


Abb. 61: Fos / nNOS Immunhistochemie des aMnPO nach osmotischer Stimulation und true blue Mikroinjektion in den pPVN

Die in den parvozellulären PVN (pPVN) mit true blue (TB) mikroinjizierten Versuchstiere wurden einer 24-stündigen Dehydrierung unterzogen. Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone im MnPO erfolgte dann immunhistochemisch im coronalen Gehirnschnitt (40 μm) mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz, unter Verwendung spezifischer Antikörper/-seren gegen nNOS und Fos, und entsprechender sekundärer, Fluorophor-gekoppelter Antikörper, wie in anderen Abbildungslegenden detailliert beschrieben. Expression der nNOS stellte sich als rotes, zytoplasmatisches Signal dar, während Fos als nukleäres, grünes Signal detektiert werden konnte. Der retrograde Tracer TB reicherte sich im Zytoplasma der neuronalen Perykaria an und erschien im histologischen Bild als blaues Signal. Computer-gestützt erfolgte die Überlagerung der drei Einzelbilder. In der Ausschnittsvergrößerung sind die verschiedenen Mehrfachmarkierungen MnPO-intrinsischer Neurone dargestellt.

Roter Pfeil: nNOS / TB positives Neuron; grüner Pfeil: nNOS / Fos positives Neuron; weißer Pfeil: nNOS / Fos / TB positives Neuron

Balken entspricht 100 μm , in der Ausschnittsvergrößerung 5 μm

Gehirnschnitt und somit 21,7 % dieser Population wiesen eine retrograde Markierung durch TB auf, während diese lediglich bei 4,8 % der nur Fos-positiven Neurone nachzuweisen war (Abb. 60). Durchschnittlich konnten $56,5 \pm 8,7$ true blue markierte Neurone/40 μm Gehirnschnitt im dorsalen Anteil des dMnPO dargestellt werden, wobei 68,8 % weder nitrerger Natur waren, noch durch den osmotischen Stimulus aktiviert wurden. 17,1 % erwiesen sich als nNOS-positiv, während 7,4 % Fos-positiv waren. Bei insgesamt 6,7 % der TB positiven Neurone konnte eine gleichzeitige Expression von nNOS und Fos nachgewiesen werden, gleichbedeutend einer Projektion der durch osmotische Stimulation des Tieres aktivierten nitrergen Neurone des MnPO in den pPVN (Abb. 59 und 60).

3.3.2.3. Ventraler *Nucleus praeopticus medianus* (vMnPO)

Im ventralen Anteil des MnPO konnte bei 22,6 % der aktivierten Neurone mit nukleärer Fos-Translokation nach osmotischer Stimulation eine Co-Lokalisation des Fos-Proteins mit nNOS dargestellt werden. $11,8 \pm 0,7$ Neurone pro 40 μm Gehirnschnitt exprimierten nNOS und zeigten sich gemäß der nachweisbaren Fos-Translokation als osmotisch aktiviert. Da weitere $7,1 \pm 0,7$ Zellen/ 40 μm Gehirnschnitt eine zusätzliche retrograde Markierung mit TB aufwiesen, entsprach der Anteil aktivierter, nitrerger Neurone mit direkter Projektion in den pPVN 37,6 % der Fos / nNOS immunopositiven Zellen (Abb. 59). 4,2 % der Fos-positiven Neurone wiesen eine TB-Markierung auf, ohne nNOS zu exprimieren. Von den durchschnittlich $62,9 \pm 7,9$ true blue positiven Zellen/ 40 μm Gehirnschnitt zeigten $10,1 \pm 0,9$ Zellen, entsprechend 16,0 % eine Co-Lokalisation. Bei einer Beteiligung aller drei Substrukturen des MnPO könnte somit vor allem der ventrale MnPO für die nitrerge Vermittlung osmotischer Signale vom MnPO an den pPVN verantwortlich sein. Statistisch zeigten sich die Werte nNOS / TB sowie nNOS / Fos / TB markierter Neurone im vMnPO als signifikant gegenüber denen des aMnPO erhöht (Abb. 59).

3.3.2.4 Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)

Parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen in Verbindung mit retrogradem neuronalem Tracing am MnPO konnte nach osmotischer Stimulation der Versuchstiere durch Wasserentzug auch die Bedeutung des OVLT für die efferente Innervation des pPVN charakterisiert werden. Parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen in Verbindung mit retrogradem neuronalem Tracing am MnPO konnte nach osmotischer Stimulation der Versuchstiere durch Wasserentzug auch die Bedeutung des OVLT für die efferente Innervation des pPVN charakterisiert werden. Insgesamt konnten durchschnittlich $118,6 \pm 5,6$ TB positive Neurone/ $40 \mu\text{m}$ im OVLT dargestellt werden.

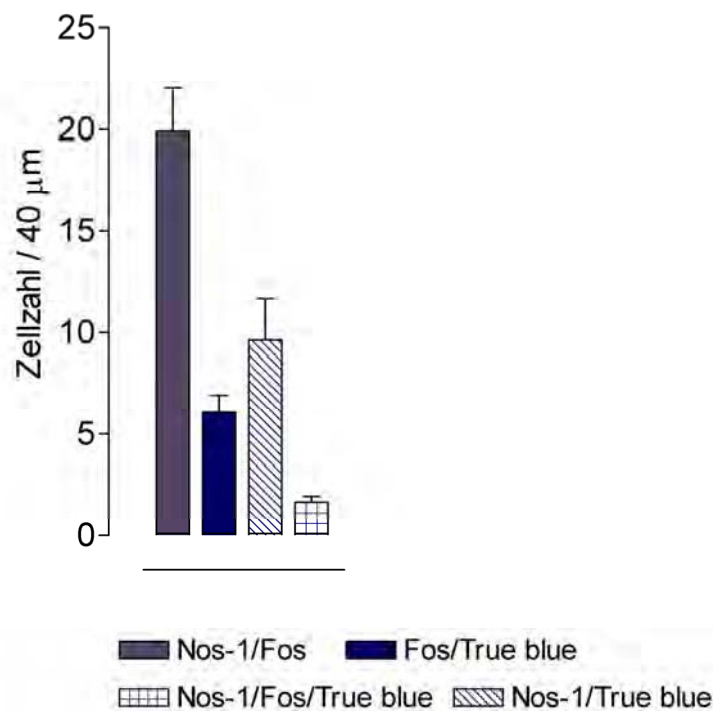


Abb. 62: Darstellung der Mehrfachmarkierungen von OVLT-Neuronen nach Mikroinjektion des neuronalen Tracers TB in den pPVN und osmotischer Stimulation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden einer Mikroapplikation des retrograden Tracers true blue (TB) in den Bereich des parvozellulären *Nucleus paraventricularis* (pPVN) sowie nach Rekonvaleszenz einem 24-stündigen Entzug des Trinkwassers unterzogen. Immunhistochemisch (Fos, nNOS) und durch Fluoreszenz-Analyse (TB) erfolgte in coronalen Gehirnschnitten für jedes Versuchstier im OVLT die Bestimmung der aus $n \geq 3$ coronalen Gehirnschnitten gemittelten Anzahlen an Zellen mit (1) nNOS / Fos, (2) Fos / TB, (3). nNOS / TB sowie (4) nNOS / Fos / TB positiven Neuronen. Die daraus resultierenden Mittelwerte wurden jeweils mit ihrem SEM als Balkendiagramm dargestellt ($n = 5$).

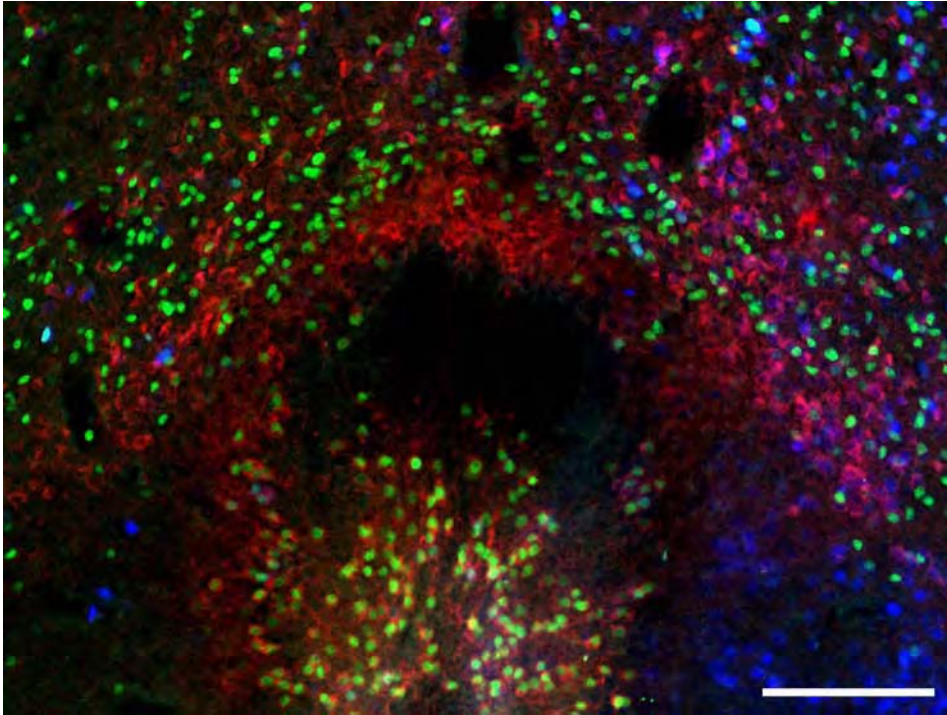


Abb. 63: Fos / nNOS Immunhistochemie des OVLT nach osmotischer Stimulation und true blue Mikroinjektion in den pPVN

Die in den parvozellulären PVN (pPVN) mit true blue (TB) mikroinjizierten Versuchstiere wurden einer 24-stündigen Dehydrierung unterzogen. Die Darstellung Fos-/nNOS-positiver Neurone im OVLT erfolgte dann immunhistochemisch im coronalen Gehirnschnitt (40 μm) mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz, unter Verwendung spezifischer Antikörper/-seren gegen nNOS und FOS, und entsprechender sekundärer, Fluorophor-gekoppelter Antikörper, wie in anderen Abbildungslegenden detailliert beschrieben. Expression der nNOS stellte sich als rotes, zytoplasmatisches Signal dar, während Fos als nukleäres, grünes Signal detektiert werden konnte. Der retrograde Tracer TB reicherte sich im Zytoplasma der neuronalen Perykaria an und erschien im histologischen Bild als blaues Signal. Computer-gestützt erfolgte die Überlagerung der drei Einzelbilder. In der Ausschnittsvergrößerung sind die verschiedenen Mehrfachmarkierungen MnPO-intrinsischer Neurone dargestellt.

Balken entspricht 100 μm

werden. Bei 85,4 % dieser Neuronengruppe, also bei weitem der Mehrheit aller Zellen, konnte keine Co-Lokalisation mit nNOS und/oder Fos nachgewiesen werden. Induziert durch die milde Dehydrierung der EZF ergab sich für die Gesamtheit aller Fos-positiven Neurone des OVLT, dass mit $6,1 \pm 0,8$ Zellen/40 μm Gehirnschnitt gar nur ein Anteil von 4,3 % in den pPVN projizierten. Es konnten $19,9 \pm 2,1$ OVLT-Neurone pro 40 μm Gehirnschnitt mit Co-Lokalisation von nNOS und Fos detektiert werden, was auf 14,2 % aller Fos-positiven Zellen pro Gehirnschnitt zutraf (Abb. 62, 63). Lediglich $1,7 \pm 0,3$ Zellen/40 μm Gehirn-

schnitt, also 8,5 % aller Fos-positiven, nitrergen Zellen projizierten dabei in den pPVN (Abb. 62). Etwa 5,1 % der TB positiven Neurone zeigten eine Aktivierung, indiziert durch nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors, während sich 8,1 % als nitrerg erwiesen; lediglich 1,4 % zeigten eine Dreifachmarkierung.

3.4. Transmitter-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion in Neuronen und Astrozyten der MnPO-Primärkultur

Osmotische Stimuli wie eine Erhöhung der Tonizität der EZF bzw. eine Reduktion des EZF-Volumens mit dadurch aktiviertem Renin-Angiotensin-System und Angiotensin II (AngII) als zirkulierendem, afferenten Botenstoff werden vornehmlich von Neuronen des *Organum subfornicale* (SFO) der *Lamina terminalis* außerhalb der BHS oder periventrikulären Osmosensoren innerhalb der BHS (z.B. im Bereich des MnPO) perzipiert. Efferenzen des SFO mit AngII als wesentlichem Neurotransmitter innervieren nachfolgend kleinzellige, MnPO-intrinsische Nervenzellen. Hypovolämische Zustände der EZF werden primär über den *Nucleus tractus solitarius* der *Medulla oblongata* als Relaisstation an Neurone des MnPO übermittelt, wobei Noradrenalin als Überträgerstoff eine bedeutende Rolle spielt. Glutamat repräsentiert seinerseits ganz allgemein den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im Hypothalamus, und dient darüber hinaus als finaler Botenstoff in der Übermittlung peripherer Temperatursignale über den Hirnstamm an die Region des MnPO.

3.4.1 Calciumabhängige intrazelluläre Signaltransduktion in Neuronen der MnPO-angereicherten Primärkultur

Im Rahmen dieser Versuchsserie an kultivierten Neuronen des MnPO sollte daher untersucht werden, ob sowohl AngII, Noradrenalin (NA) als auch Glutamat (Glu) in der Lage sind, MnPO-intrinsische Neurone zu aktivieren und etwa eine calciumabhängige, intrazelluläre Signaltransduktion induzieren zu können. Darüber hinaus war es von Interesse herauszufinden, inwieweit eine funktionelle zelluläre Co-Expression der jeweiligen Rezeptortypen besteht. Hierfür wurden AngII, NA und Glutamat, wie in Kap. 2.4.10. beschrieben, in randomisierter Reihenfolge dem Superfusat einer MnPO-Primärkultur zugeführt und mit-

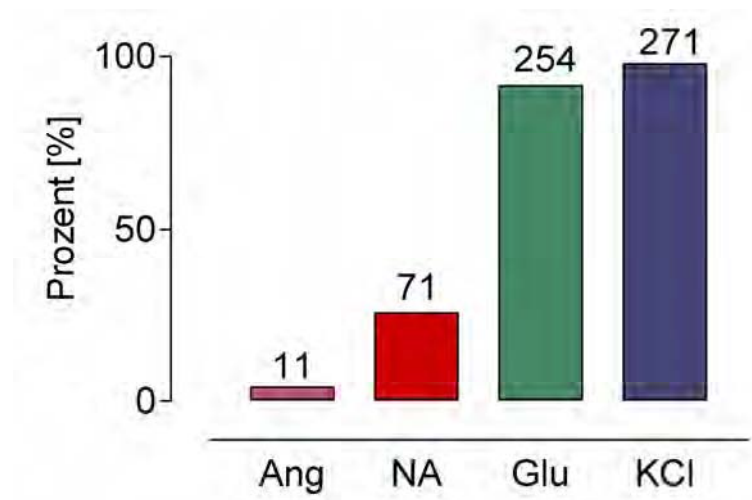


Abb. 64: Darstellung des prozentualen Anteils responsiver MnPO Neurone nach Superfusionstimulation mit AngII, NA, Glu und Kaliumchlorid

Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil responsiver Neurone der MnPO-Primärkultur auf eine Stimulation mit Angiotensin II (AngII; 10^{-6} M/L), Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), Glutamat (Glu; 10^{-5} M/L) und Kaliumchlorid (50 mM/L) in Messpuffer. Die Zahlen über den Balken stellen die absolute Anzahl responsiver Neurone aus mehreren Präparationen dar. Es gingen insgesamt 277 Neurone in diese Auswertung ein.

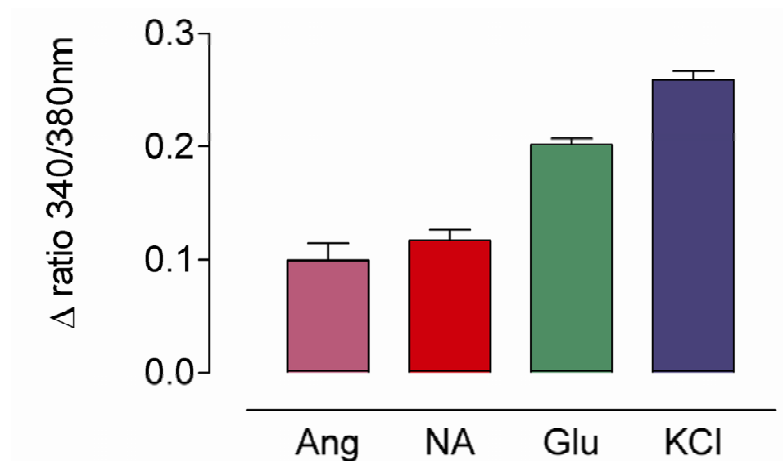


Abb. 65: Durchschnittliche Ratio-Erhöhung responsiver MnPO Neurone nach Superfusionsstimulation mit AngII, NA, Glu und Kaliumchlorid

Dieses Balkendiagramm gibt die durchschnittliche Erhöhung der jeweiligen 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio in Neuronen nach Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Angiotensin II (AngII; 10^{-6} M/L), Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), Glutamat (Glu; 10^{-5} M/L) und KCl (50 mM/L) in Messpuffer als arithmetischen Mittelwert \pm SEM an.

tels Calcium-Imaging zelluläre Antworten MnPO-intrinsischer Neurone registriert (Abb. 68). Um die Vitalität derjenigen Neurone in der Kultur nachzuweisen, die auf keinen der Neurotransmitter mit einer Erhöhung des $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierten, wurde Kaliumchlorid (max. 35 mM/L Badkonzentration) als Kontrollstimulus eingesetzt (Abb. 68). 271 der getesteten 277 Neurone aus 11 Zellpräparationen zeigten nach Superfusion mit Messpuffer hoher Kaliumchlorid-Konzentration eine Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio um durchschnittlich $0,26 \pm 0,05$ Ratio-Einheiten (Abb. 64, 65).

Auf die Superfusion mit AngII in einer finalen Konzentration von 10^{-6} M/L reagierten 4 % der 271 Neurone mit einer Erhöhung des $[Ca^{2+}]_{iz}$ um $0,09 \pm 0,01$ Ratio-Einheiten (Abb. 64, 65). Dieser entgegen den Erwartungen niedrige Anteil AngII-responsiver Neurone könnte auf einer vermehrten Internalisation des AT_1 -Rezeptors unter Kulturbedingungen zurückzuführen sein (Brenner, 2002; Poupart *et al.*, 2007). Durch Applikation einer NA-haltigen Messpuffer-Lösung

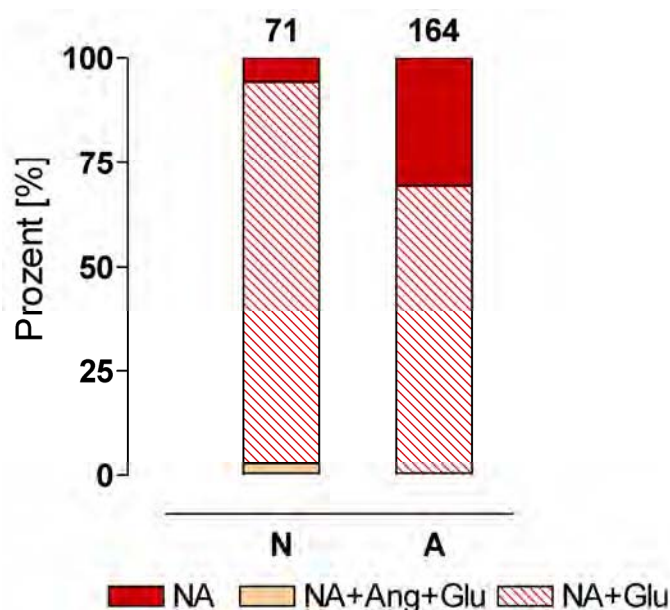


Abb. 66: Co-Eexpression funktioneller Rezeptorproteine für NA, Ang II und Glutamat bezogen auf NA-responsive Neurone und Astrozyten

Prozentuale Anteile NA-responsiver Neurone N (n = 71) sowie Astrozyten A (n = 164) in der MnPO Primärkultur, die ebenfalls auf Glutamat, bzw. Glutamat und AngII mit einer Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio reagierten.

(10^{-6} M/l) konnte bei 26 % der untersuchten Neurone eine Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio dokumentiert werden, welche durchschnittlich $0,11 \pm 0,08$ Ratio-Einheiten betrug (Abb. 64, 65). 94 % der getesteten MnPO-Neurone hingegen reagierten auf die Superfusionsstimulation mit Glutamat (10^{-5} M/L) mit einer mittleren Ratio-Änderung von $0,20 \pm 0,05$ (Abb. 64, 65).

Somit wurde nachgewiesen, dass sowohl AngII als auch NA und Glutamat in den Neuronen der MnPO-angereicherten Primärkultur eine Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ induzieren konnten. Zahlreiche *in vivo* Untersuchungen demonstrierten die integrative Funktion MnPO-intrinsischer Neurone für afferente osmo-, volumen- und thermoregulatorische Signale (Gerstberger *et al.* 2001; Johnson & Thunhorst, 1997). Somit war es von Interesse zu ermitteln, inwieweit einzelne Neurone auf zwei oder alle drei der getesteten Neurotransmitter mit einem intrazellulären Calciumsignal antworten würden. Dadurch könnte der Nachweis einer funktionellen Co-Expression spezifischer Rezeptoren für AngII, NA und Glutamat in ein und demselben MnPO-Neuron erbracht werden.

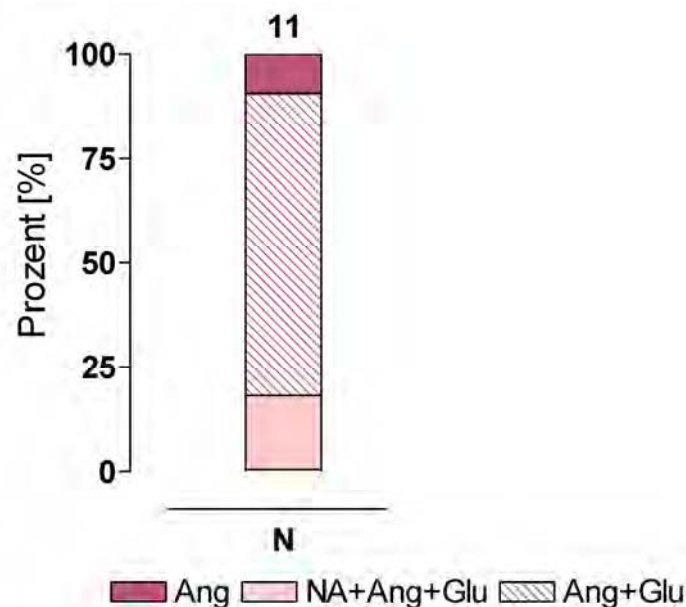


Abb. 67: Funktionelle Co-Expression von Rezeptoren für NA, Glu und AngII in AngII-responsiven MnPO-Neuronen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller AngII (10^{-6} M/L) -responsiven Neurone ($n = 11$) der MnPO-Primärkultur, die zusätzlich auf Superfusionsstimulation mit Glutamat (Glu, 10^{-5} M/L) oder Glu und Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L) mit einer Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio reagierten.

Hierzu wurden die 71 NA-responsiven MnPO-Neurone als Bezugspopulation herangezogen. 92 % dieser Nervenzellen reagierten bei randomisiert sequenzieller Applikation von NA und Glutamat jeweils mit einer Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio und wiesen somit eine funktionelle Co-Expression Noradrenalin- und Glutamat-spezifischer Rezeptorsubtypen auf (Abb. 66). Lediglich 3 % der NA / Glutamat -responsiven MnPO-Neurone zeigten auch nach Superfusion mit AngII eine Änderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ (Abb. 66). Dies lässt für diese Neurone sowohl zusätzlich auf das Vorkommen eines AngII-Rezeptorsubtyps, vermutlich vom AT1-Typ, schließen. Deklariert man nun die kleine Anzahl AngII-responsiver MnPO-Neurone als Bezugspopulation, so antworteten 90 % dieser Zellen auch auf glutamaterge Stimulation und lediglich 18 % auf NA als Neurotransmitter (Abb. 67). Abb. 68 zeigt das Ergebnis eines exemplarischen Calcium-Imaging Experiments mit allen drei Neurotransmittern in sequentieller Applikation und einer finalen Superfusion mit Messpuffer hoher Kaliumchlorid Konzentration.

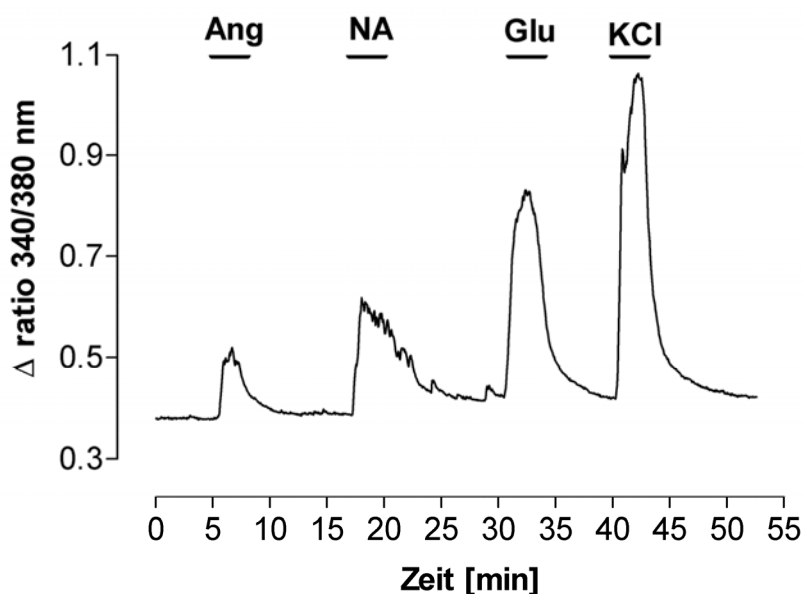


Abb. 68: Einzelversuch zur Erfassung intrazellulärer Calciumsignale in einem Neuron der MnPO-Primärkultur

Dieses Beispiel zeigt das Antwortverhalten eines MnPO-Neurons auf die sequentielle Superfusionsstimulation der MnPO Primärkultur mit Angiotensin II (AngII; 10^{-6} M/L), Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), Glutamat (Glu; 10^{-5} M/L) sowie Messpuffer mit erhöhter Kaliumkonzentration. Das MnPO-Neuron antwortete auf alle drei Transmitter mit einer eindeutigen Erhöhung der 380 / 340 nm Fluoreszenz Ratio. Das markante intrazelluläre Calciumsignal aufgrund der Kalium-induzierten Depolarisation am Ende der Registrierung weist diese Zelle eindeutig als Neuron aus.

3.4.2. Calciumabhängige intrazelluläre Signaltransduktion in Astrozyten der MnPO-angereicherten Primärkultur

Es wurden im Rahmen derselben Versuchserie insgesamt 244 Astrozyten auf ihre Responsivität gegenüber AngII, NA und Glu untersucht. Am Ende eines jeden Versuchs erfolgte, wie für die Neurone beschrieben, ein Teststimulus mit Kalium-angereichertem Messpuffer. Fehlende Responsivität wurde jedoch nicht als Ausschlusskriterium herangezogen, da lediglich 10 - 40 % aller MnPO-Astrozyten nach Kalium-induzierter Depolarisation ein intrazelluläres Calciumsignal zeigen (Brenner, 2002; Wuchert *et al.* 2008). Durch die 3-minütige Superfusion mit AngII-haltigem Messpuffer (10^{-6} M/L) konnte keine Calciumabhängige Signaltransduktion in den Astrozyten der MnPO-Kultur induziert werden (Abb. 69). Im Gegensatz dazu reagierten 68 % der getesteten Astrozyten auf NA (10^{-6} M/L) und 75 % auf Glutamat (10^{-5} M/L) mit einer Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio um durchschnittlich $0,21 \pm 0,07$ respektive $0,15 \pm 0,05$ Ratio-Einheiten (Abb. 70). In dieser Studie bewirkte die Superfusion des Messpuffers mit hoher Kaliumchlorid-Konzentration eine Änderung

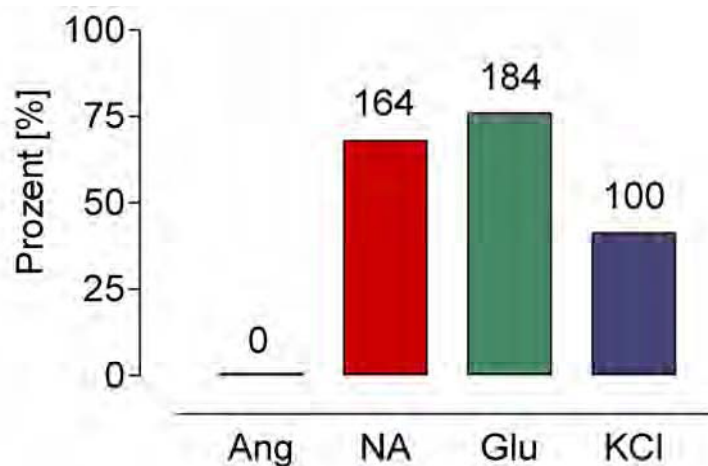


Abb. 69: Darstellung des prozentualen Anteils responsiver MnPO Astrozyten nach Superfusionstimulation mit AngII, NA, Glu und Kaliumchlorid

Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil responsiver Astrozyten der MnPO-Primärkultur auf eine Stimulation mit Angiotensin II (AngII; 10^{-6} M/L), Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), Glutamat (Glu; 10^{-5} M/L) und Kaliumchlorid (50 mM/L) in Messpuffer. Die Zahlen über den Balken stellen die absolute Anzahl responsiver Astrocyten aus mehreren Präparationen dar. Es gingen insgesamt 244 Astrozyten in diese Auswertung ein.

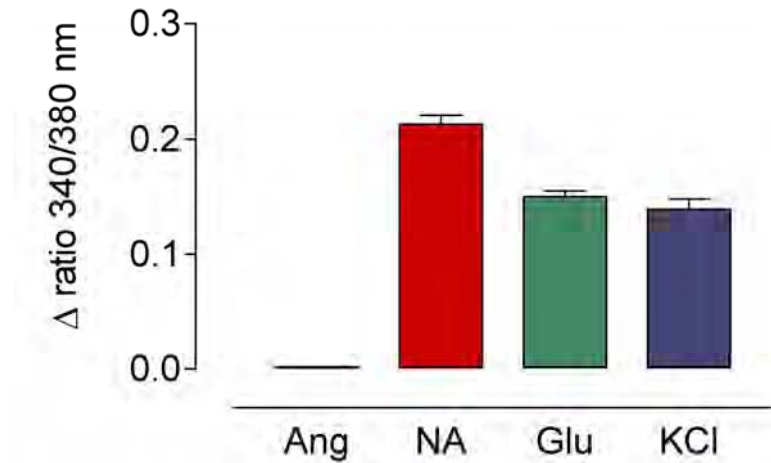


Abb. 70: Durchschnittliche Ratio-Erhöhung responsiver MnPO Astrozyten nach Superfusionsstimulation mit AngII, NA, Glu und Kaliumchlorid

Dieses Balkendiagramm gibt die durchschnittliche Erhöhung der jeweiligen 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio in Astrozyten nach Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Angiotensin II (AngII; 10^{-6} M/L), Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), Glutamat (Glu; 10^{-5} M/L) und KCl (50 mM/L) in Messpuffer als arithmetischen Mittelwert \pm SEM an.

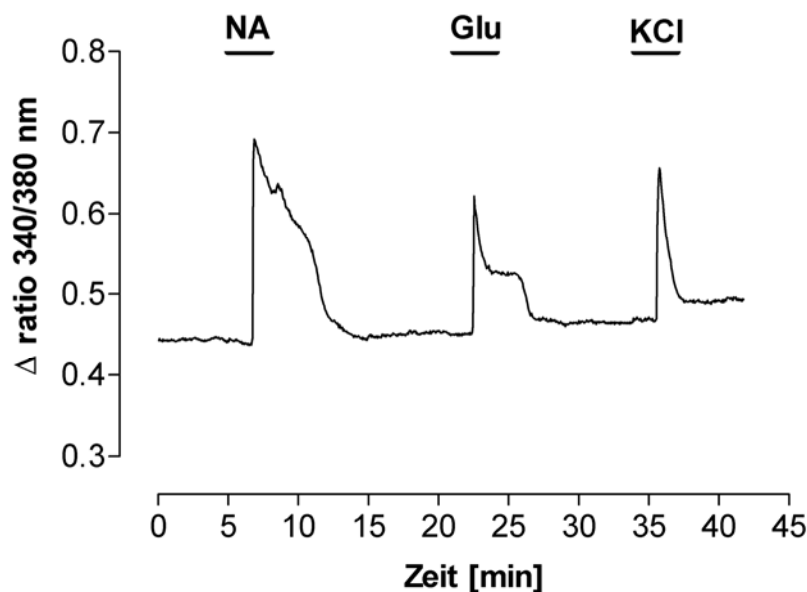


Abb. 71: Einzelversuch zur Erfassung intrazellulärer Calciumsignale in einem Astrozyten der MnPO-Primärkultur

Dieses Beispiel zeigt das Antwortverhalten eines MnPO-Astrozyten auf die sequentielle Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), Glutamat (Glu; 10^{-5} M/L) sowie Messpuffer erhöhter Kaliumkonzentration. Der MnPO-Astrozyt antwortete mit einer eindeutigen Erhöhung der 380 / 340 nm Fluoreszenz Ratio. Das transiente intrazelluläre Calciumsignal aufgrund der Kalium-induzierten Depolarisation am Ende der Registrierung erwies sich für ca. 40 % aller Astrozyten als charakteristisch.

der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio in 41 % der Astrocyten um $0,13 \pm 0,08$, gleichbedeutend mit einer Depolarisation des Membranpotentials (Abb. 69, 70). Unter Bezugnahme auf die 168 NA-responsiven MnPO-Astrozyten wiesen 70 % dieser Zellen eine Co-Aktivierbarkeit durch superfundiertes Glutamat (10^{-5} M/L) auf (Abb. 66). In Abb. 71 ist das Ergebnis eines exemplarischen Calcium-Imaging Experiments für einen Astrozyt der MnPO-Primärkultur demonstriert.

Die durch Superfusionsstimulation mit AngII (10^{-6} M/L) induzierten intrazellulären Calciumsignale konnten in drei wesentliche Muster differenziert werden (Abb. 81). 36 % der AngII-responsiven MnPO-Neurone reagierten mit einem innerhalb von wenigen Sekunden erfolgenden Anstieg des $[Ca^{2+}]_{iz}$ und nachfolgendem graduellen Abfall des Calciumsignals über 4-5 min bis auf den Basalwert (Typ B). Bei spikeförmigen Signalen hingegen erfolgten Anstieg und Abnahme der $[Ca^{2+}]_{iz}$ innerhalb weniger Sekunden (Typ C), ein Reaktionsmuster, welches 55 % der untersuchten Neurone auf angiotensinerge Stimulation zeigten. Oszillationen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ konnten bei 9 % der MnPO-Neurone registriert werden (Typ D).

3.4.3. Charakterisierung des in Neuronen und Astrozyten der MnPO Primärkultur exprimierten Adrenozeptor-Subtyps

Im Rahmen der Volumenhomöostase der EZF werden vagale Afferenzen vorrangig aus dem Niederdrucksystem bzw. dem Pfortaderbereich der Leber nach Umschaltung im medullären NTS sowie partiell dem pontinen *Nucleus parabrachialis* auf den pPVN sowie den MnPO verschaltet, mit NA als primärem Neurotransmitter.

3.4.3.1. Funktionelle Charakterisierung in der der MnPO-Primärkultur

Die ausgeprägte Aktivierbarkeit von Neuronen (ca. 26 %) und Astrozyten (ca. 68 %) der MnPO Primärkultur durch Noradrenalin legte die Notwendigkeit einer pharmakologischen Charakterisierung der beteiligten Adrenozeptoren nahe. Dabei fand in dieser Arbeit aufgrund der angewandten Technik des Calcium Imaging eine Beschränkung auf den α_1 -Rezeptorsubtyp statt.

So erfolgte in jeweils mehreren Mikrokammern aus insgesamt 10 Zellpräparationen die Superfusionsstimulation zunächst mit Noradrenalin (10^{-6} M/L) und nachfolgender Applikation des α_1 -Rezeptorsubtyp-spezifischen Agonisten Phenylephrin (PHE) in äquimolarer Konzentration (10^{-6} M/L). Am Ende des Versuches wurde wiederum mit NA (10^{-6} M/L) als post-experimenteller Stimulus dem Perfusat zugefügt. Von den 71 NA-responsiven MnPO-Neuronen konnte bei 15 die sequentielle Stimulation mit NA – PHE – NA dahingehend erfolgreich durchgeführt werden, dass nach Superfusion mit PHE eine zelluläre Antwort auch auf den zweiten, post-experimentellen NA-Stimulus verzeichnet werden konnte (21,1 %). Dies entspricht auch gleichzeitig der Anzahl NA-responsiver Zellen, die sich auch durch PHE aktivieren ließen (Abb. 76). Die getesteten Neurone reagierten auf die erste Superfusion mit NA mit einer Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio um $0,12 \pm 0,02$, die Applikation des α_1 -Agonisten um $0,08 \pm 0,01$ sowie die zweite Stimulation mit NA um $0,09 \pm 0,01$ (Abb. 72, 73).

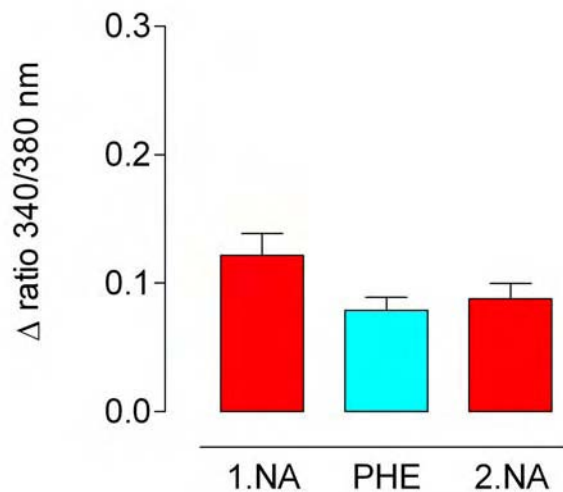


Abb. 72: Sequentielle Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin und Phenylephrin: neuronale Antworten

Neurogliale, Fura-2 beladene Primärkulturen des MnPO wurden sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), dem α_1 -Agonisten Phenylephrin (PHE; 10^{-6} M/L) und wiederum NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist die gemittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$), bestimmt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, jeweils mit SEM ($n = 15$). Der statistische Vergleich mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimulationsphasen.

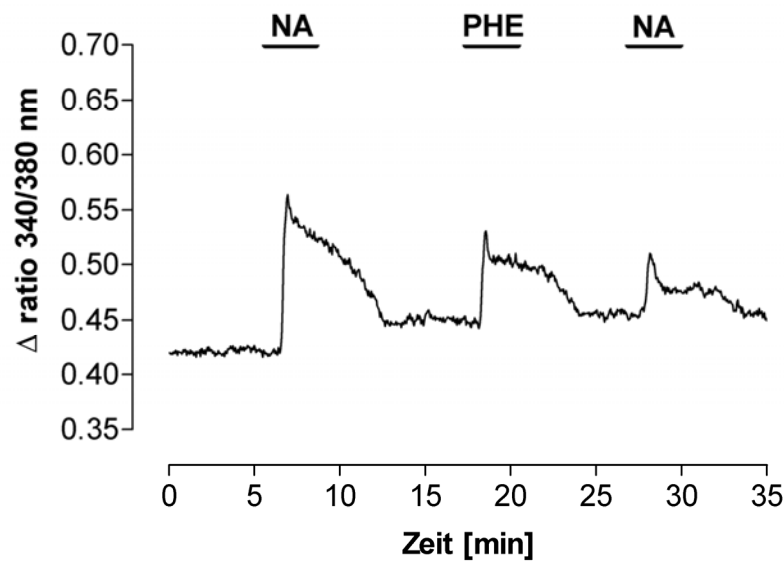


Abb. 73: Sequentielle Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin und Phenylephrin: exemplarische neuronale Antwort

Eine neurogliale, Fura-2 beladene Primärkultur des MnPO wurde sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), dem α_1 -Agonisten Phenylephrin (PHE; 10^{-6} M/L) und wiederum NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der durch Ratio Imaging charakterisierten intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) eines MnPO-Neurons, dargestellt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio.

Im statistischen Vergleich der mittleren 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio Änderungen konnte bei den Neuronen sowohl zwischen erstem und zweiten NA-Stimulus, als auch dem PHE-Stimulus kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abb. 72). Eine durch die repetitive Superfusionsstimulation möglicherweise induzierte Desensibilisierung des noradrenerg bewirkten Calciumsignals kann somit für diese Zellen ausgeschlossen werden. In äquimolarer Konzentration eingesetzt erwies sich PHE somit als äquipotent im Vergleich mit NA.

Von den 164 NA-responsiven MnPO-Astrozyten konnte bei 27 die sequentielle Stimulation mit NA – PHE – NA durchgeführt werden. Die erste Superfusionsstimulation mit NA führte zu einem markanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$, gemessen als 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, um $0,24 \pm 0,01$ Einheiten. Die nachfolgende Superfusion der NA-responsiven Astrozyten mit äquimolarem PHE bewirkte bei 16,5 % dieser Zellen eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_{iz}$ um $0,12 \pm 0,01$

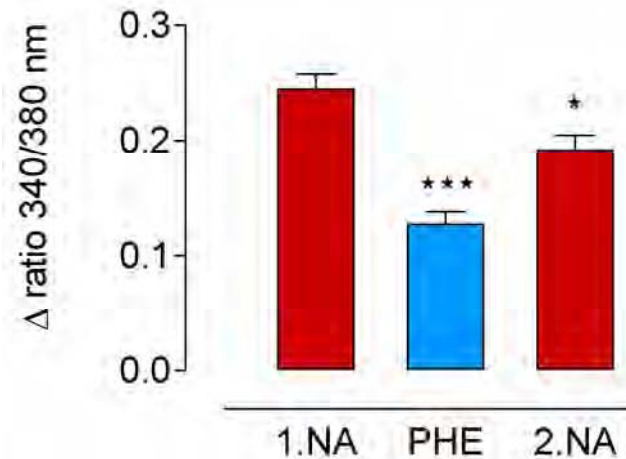


Abb. 74: Sequentielle Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin und Phenylephrin: astrozytäre Antworten

Neurogliale, Fura-2 beladene Primärkulturen des MnPO wurden sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), dem α_1 -Agonisten Phenylephrin (PHE; 10^{-6} M/L) und wiederum NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist die gemittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$), bestimmt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, jeweils mit SEM ($n = 27$). Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum ersten, mit (#) gekennzeichnete Daten auf signifikante Unterschiede zum zweiten NA-Stimulus hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (*[#]) $2p \leq 0,05$; *** $2p \leq 0,001$).

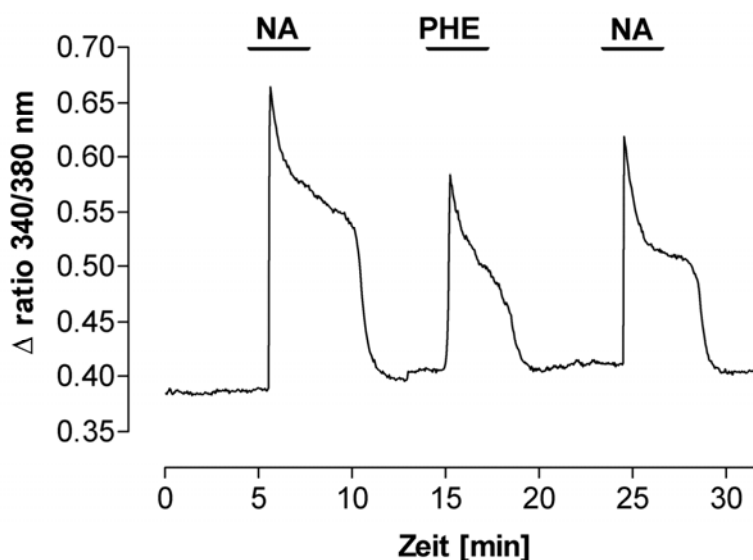


Abb. 75: Sequentielle Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin und Phenylephrin: exemplarische astrozytäre Antwort

Eine neurogliale, Fura-2 beladene Primärkultur des MnPO wurde sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L), dem α_1 -Agonisten Phenylephrin (PHE; 10^{-6} M/L) und wiederum NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der durch Ratio Imaging charakterisierten intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) eines MnPO-Astrozyten, dargestellt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio.

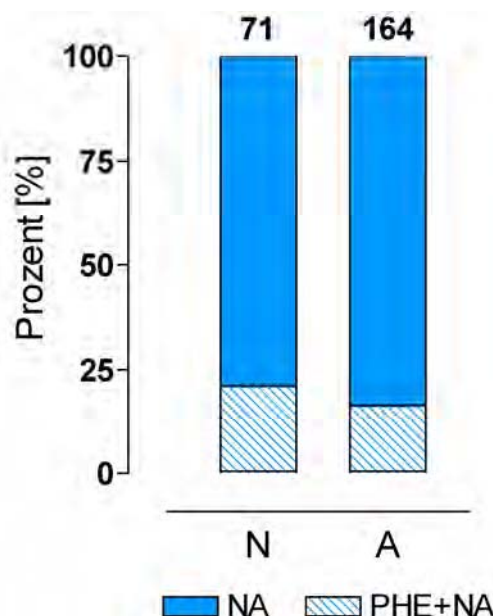


Abb. 76: Funktionelle Expression des α_1 -Adrenozeptors in der MnPO-Primärkultur

Von allen in der MnPO-Primärkultur durch NA-Superfusion (10^{-6} M/L) aktivierbaren Neuronen (N) und Astrozyten (A) – den über den Balken angegebenen Zellzahlen entsprechend – ließen sich Teilpopulationen auch durch den α_1 -spezifischen Agonisten Phenylephrin (PHE) in äquimolarer Konzentration stimulieren. Die schraffierten Flächen stellen den prozentualen Anteil der ebenfalls PHE-responsiven Zellen dar.

Ratio-Einheiten (Abb. 74, 76). Die postexperimentelle, zweite NA-Applikation hatte eine Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio um $0,1X \pm 0,0X$ zur Folge. Für die Astrozyten zeigte sich somit, dass die aus dem zweiten NA-Stimulus resultierende Ratio-Änderung im Vergleich zur ersten marginal, wenn auch signifikant niedriger ($2p \leq 0,05$) ausfiel. Die durch äquimolares PHE bedingte Änderung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio erwies sich sowohl im Vergleich zum ersten als auch zweiten NA-Stimulus als signifikant erniedrigt ($2p \leq 0,001$).

In einer weiteren Versuchsserie zur Beteiligung des α_1 -Adrenozeptors an der NA-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ sollte untersucht werden, inwieweit Prazosin (Praz) als selektiver Antagonist für α_1 -Adrenozeptoren die durch NA vermittelte Erhöhung des $[Ca^{2+}]_{iz}$ zu unterdrücken vermochte. In der Gruppe der Neurone konnte die durch NA (10^{-6} M/L) induzierte Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio um $0,18 \pm 0,02$ in der nachfolgenden Stimulationsperiode mit

NA in Gegenwart von Prazosin (10^{-7} M/L) signifikant ($2p \leq 0,01$) auf $0,02 \pm 0,01$ reduziert werden. Die nach der Prazosin-Superfusion erfolgende post-experimentelle Stimulation mit NA führte zu einer durch die erste NA-Applikation vergleichbaren Änderung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,11 \pm 0,04$ (Abb. 77). Ein Beispiel des durch Prazosin inhibierten, NA-induzierten Calciumsignals bei MnPO-Neuronen ist in Abb. 78 dargestellt.

In der Gruppe der Astrozyten bedingte die erste Superfusionsstimulation mit 10^{-6} M/L NA eine Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio um $0,18 \pm 0,02$. Unter dem Einfluss von Prazosin erfolgte die hochsignifikante ($2p \leq 0,001$) und nahezu vollständige Reduktion des Calciumsignals auf Werte von $0,009 \pm 0,001$ Ratio-Einheiten (Abb. 79). Wie bei den Neuronen war es auch bei den Astrozyten möglich, nach Rezeptorblockade eine post-experimentelle, erneute, NA-bedingte Induktion des intrazellulären Calciumsignals auszulösen, welches sich in einer 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio Änderung von $0,09 \pm 0,01$ manife-

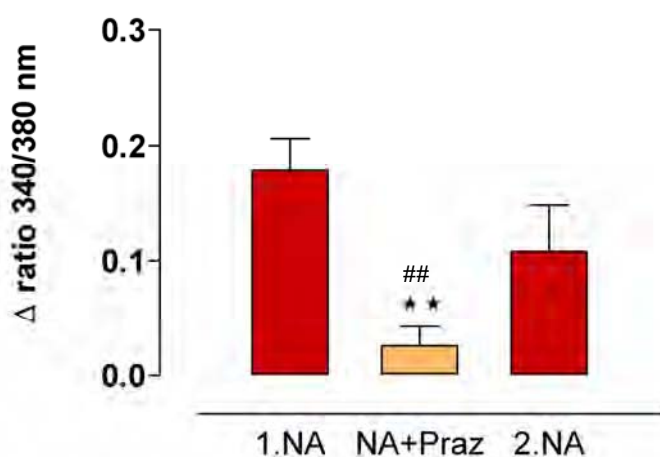


Abb. 77: Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin während Blockade der α_1 -Adrenozeptoren : neuronale Antworten

Neurogliale, Fura-2 beladene Primärkulturen des MnPO wurden sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L) alleine, NA in Gegenwart des α_1 -Antagonisten Prazosin (Praz; 10^{-7} M/L) und wiederum alleine NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist die gemittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$), bestimmt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, jeweils mit SEM ($n = 3$). Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum ersten, mit (#) gekennzeichnete Daten auf signifikante Unterschiede zum zweiten NA-Stimulus hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** (#) $2p \leq 0,01$).

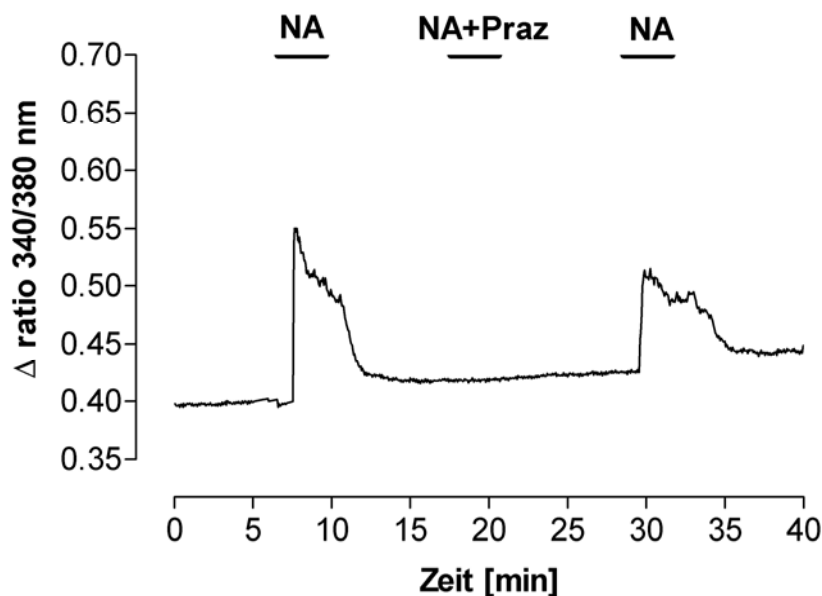


Abb. 78: Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin während Blockade der α_1 -Adrenozeptoren : exemplarische neuronale Antwort

Eine neurogiale, Fura-2 beladene Primärkultur des MnPO wurde sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L) alleine, NA in Gegenwart des α_1 -Antagonisten Prazosin (Praz; 10^{-7} M/L) und wiederum NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der durch Ratio Imaging charakterisierten intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) eines MnPO-Neurons, dargestellt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio.

stierte. Im Vergleich zur ersten NA-Stimulation war diese signifikant ($2p \leq 0,01$), im Vergleich zur Ratio-Änderung unter Prazosin hochsignifikant ($2p \leq 0,001$) verschieden. Ein Beispiel des durch Prazosin inhibierten, NA-induzierten Calciumsignals bei MnPO-Astrozyten ist in Abb. 80 dargestellt.

Die durch Noradrenalin hervorgerufene, markante Stimulation des intrazellulären Calcium-Signaltransduktionswegs konnte für Neurone bzw. Astrozyten der MnPO-Primärkultur somit in etwa 25 % (N) bzw 16 % (A) der Zellen ebenso durch den α_1 -Agonisten Phenylephrin induziert werden. Die potente Hemmung der noradrenergen Stimulation durch den α_1 -spezifischen Antagonisten Prazosin in nahezu allen darauf getesteten NA-responsiven Zellen ($n=3-6$) unterstützt die offensichtlich maßgebliche Beteiligung des α_1 -Adrenozeptors an den erhaltenen NAergen, zellulären Antworten.

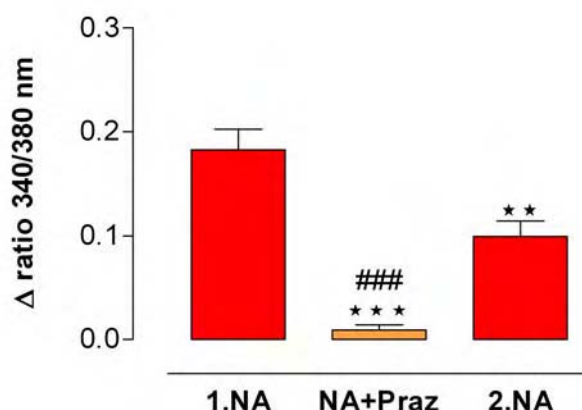


Abb. 79: Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin während Blockade der α_1 -Adrenozeptoren : astrozytäre Antworten

Neurogliale, Fura-2 beladene Primärkulturen des MnPO wurden sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L) alleine, NA in Gegenwart des α_1 -Antagonisten Prazosin (Praz; 10^{-7} M/L) und wiederum alleine NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist die gemittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$), bestimmt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, jeweils mit SEM ($n = 6$). Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Daten weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum ersten, mit (#) gekennzeichnete Daten auf signifikante Unterschiede zum zweiten NA-Stimulus hin. Gemäß des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Rangtests: (** $2p \leq 0,01$; *** (###) $2p \leq 0,001$).

Die durch Superfusion der MnPO-Primärkultur mit NA (10^{-6} M/L) induzierten neuronalen Calciumsignale erwiesen sich in erster Linie dem Reaktionstyp B zugehörig (49 %), während auf den Typ C 27 % entfielen und 15 % der NA-responsiven Neurone die für Typ D typischen Oszillation der intrazellulären Calciumkonzentration zeigten (Abb. 81). Im Vergleich zu den durch angiotensinerge Stimulation hervorgerufenen Calciumsignalen konnte in der Gruppe der NA-responsiven Neurone ein viertes Reaktionsmuster beobachtet werden. Dabei folgte bei 8 – 9 % der MnPO-Neurone auf einen raschen, spikeförmigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ die Bildung einer bis zu sechs min anhaltenden Plateauphase mit anschließendem Abfall auf den Basalwert (Typ A) (Abb. 81). Nach Superfusion mit Phenylephrin ergab sich eine zur NA-Stimulation differente Häufigkeitsverteilung der Muster A – D. So konnte Typ A gar nicht nachgewiesen werden, während die Typen B und C in 39 respektive 56 % der PHE-responsiven Neurone demonstriert werden konnten. Etwa 5 % der Neurone zeigten eine Oszillation des Calciumsignals gemäß Muster D. Diese Diskrepanz

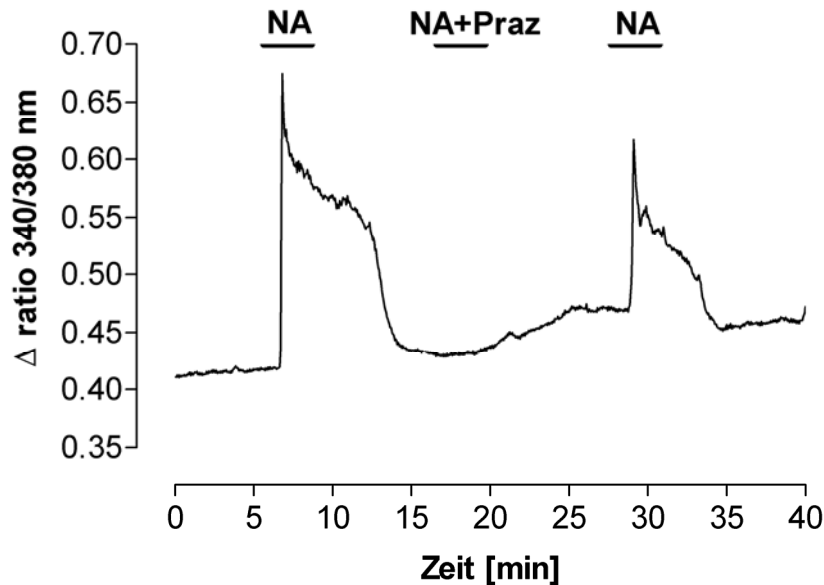


Abb. 80: Superfusionsstimulation der MnPO-Primärkultur mit Noradrenalin während Blockade der α_1 -Adrenozeptoren : exemplarische astrozytäre Antwort

Eine neurogliale, Fura-2 beladene Primärkultur des MnPO wurde sequentiell mit Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L) alleine, NA in Gegenwart des α_1 -Antagonisten Prazosin (Praz; 10^{-7} M/L) und wiederum NA (10^{-6} M/L) durch Superfusion für jeweils drei min stimuliert. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der durch Ratio Imaging charakterisierten intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) eines MnPO-Astrozyten, dargestellt als Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio.

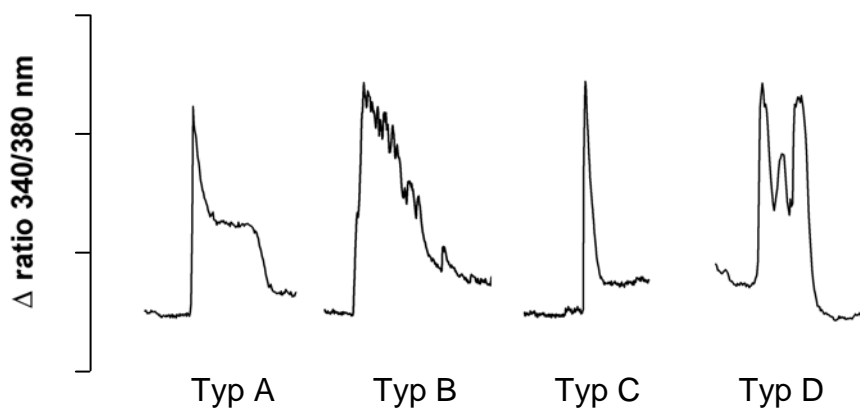


Abb 81: Muster der durch Stimulation mit AngII, Noradrenalin und Phenylephrin induzierten zellulären Calciumsignale

- Typ A: Plateauförmiges Calciumsignal, bei welchem dem Anstieg nach Absinken auf ein niedrigeres Niveau eine längere Plateauphase folgt
- Typ B: Spikeförmiges Signal, bei welchem dem raschen Anstieg eine stetige Abnahme des Calciumsignals bis auf den Basalwert folgt
- Typ C: Spikeförmiges Calciumsignal, bei welchem dem raschen Anstieg ein ebenso schneller Abfall des Calciumsignals auf den Basalwert folgt
- Typ D: Oszillierende Calciumsignale

war jedoch darauf zurückzuführen, dass lediglich 18 % aller durch NA aktivierbaren MnPO-Neuronen offensichtlich einen funktionellen α_1 -Rezeptor exprimierten; bei diesen Zellen induzierten NA und PHE Calciumsignale mit vergleichbarem Muster (Abb. 73).

Während in der Gruppe der NA-responsiven Neurone der MnPO-Primärkultur lediglich eine geringe Anzahl dem Reaktionsmuster des Typs A zuzuordnen waren, reagierten in der Gruppe der NA-responsiven Astrozyten 73 % mit diesem Reaktionstyp (Abb. 81). Möglicherweise liegt diesem Antworttyp ein sequentieller bzw. überlagerter Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum und Ausstrom aus intrazellulären Speichern in das Zytosol zugrunde (Nilsson *et al.*, 1991; Shao & McCarthy, 1993). Etwa 20 % der Astrozyten zeigten spikeförmige Signale mit Anstieg und Abfall der $[Ca^{2+}]_{iz}$ innerhalb weniger Sekunden vom Typ C, während lediglich jeweils 2 – 4 Prozent der Astrozyten auf die Muster B und D entfielen. Vergleichbar zur Situation bei den Neuronen der MnPO Primärkultur führte die Einteilung der durch Superfusionsstimulation mit PHE bedingten Reaktionsmuster zu deutlichen Unterschieden. So resultierte bei 56 % der Astrozyten durch Stimulation mit PHE ein Calciumsignal nach Typ C, 26 % waren dem Muster vom Typ A und 18 % dem Typ D zuzuordnen. Wie schon für die Neurone angedeutet, ergab sich für die Population der sowohl NA- als auch PHE-responsiven Zellen aber eine übereinstimmende Musterverteilung nach Superfusionsstimulation mit NA bzw. PHE. Der Unterschied zwischen der Musterverteilung bei Zellen mit induzierbarem Calciumsignal alleinig nach Applikation von Noradrenalin und solchen nach Noadrenalin sowie Phenylephrin deutet daraufhin, dass in ersteren durch NA neben den α_1 -Adrenozeptoren auch β -Adrenozeptoren und / oder postsynaptische α_2 -Adrenozeptoren aktiviert wurden.

3.4.3.2. Immunzytochemischer Nachweis des α_1 -Adrenozeptors in MnPO-Zellen

Mittels der in Kap. 2.4.5 beschriebenen indirekten Immunfluoreszenz gelang im Rahmen dieser Arbeit der immunhistologische und -zytologische Nachweis der α_1 -Adrenozeptor Expression im MnPO sowohl im Gewebeschnitt als auch in der

primären Zellkultur. Bei moderater Immunreaktion im Bereich des aMnPO konnte eine hohe Dichte immunreaktiver Zellen, Zellausläufer und Punctata für den dMnPO sowie den zwischen drittem Hirnventrikel und *Commissura anterior* lokalisierten vMnPO demonstriert werden (Abb. 82). Ein für den α_1 -Adrenozeptor spezifisches, immunhistologisches Signal wurde darüber hinaus für beide Strukturkomponenten des OVLT verifiziert, wobei eine markante Expression des Rezeptors vor allem für dessen vaskulären Anteil aufgezeigt werden konnte (Abb. 82). Eine Co-Lokalisation des immunreaktiven Signals mit spezifischen Markerproteinen für den Nachweis etwa von markierten Neuronen, Astrozyten oder anderen Gliazelltypen wurde im Gehirnschnitt nicht durchgeführt, wohl aber in der neuroglialen Primärkultur des MnPO (Abb. 83).

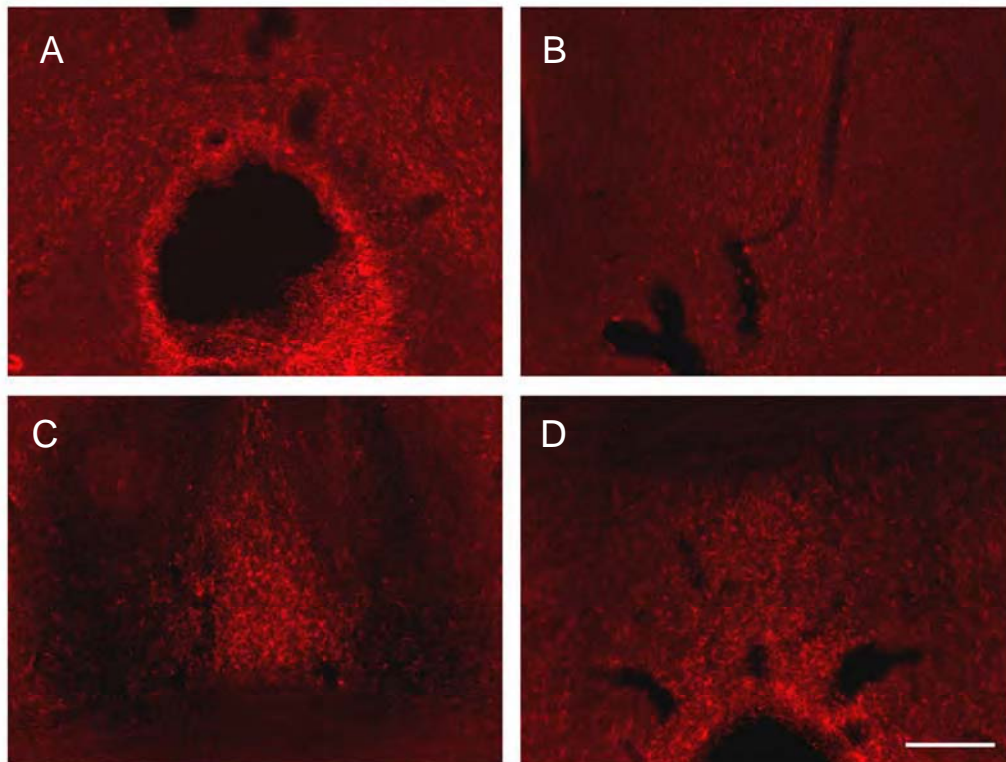


Abb. 82: Immunhistochemischer Nachweis der α_1 -Adrenozeptor Expression im Bereich des MnPO

Die Darstellung des α_1 -adrenergen Rezeptorproteins in Zellen des MnPO sowie des OVLT erfolgte immunhistochemisch im coronalen Gehirnschnitt (40 μm) mittels kombinierter indirekter Immunfluoreszenz, unter Verwendung eines spezifischen polyklonalen *rabbit-anti- α_1 -Adrenoceptor* (1:500) Antiserums und des Fluorophor-gekoppelter sekundären Antikörpers *Cy3TM-donkey-anti-rabbit IgG* (1:800).

(A) OVLT, (B) aMnPO, (C) dMnPO, (D) vMnPO

Balken entspricht 100 μm

In der Zellkultur konnte durch die Kombination mit zellspezifischen Markern, wie MAP2a+b für Neurone und GFAP für Astrozyten, die Expression des α_1 -Adrenozeptors in beiden genannten Zelltypen dargestellt werden (Abb. 83).

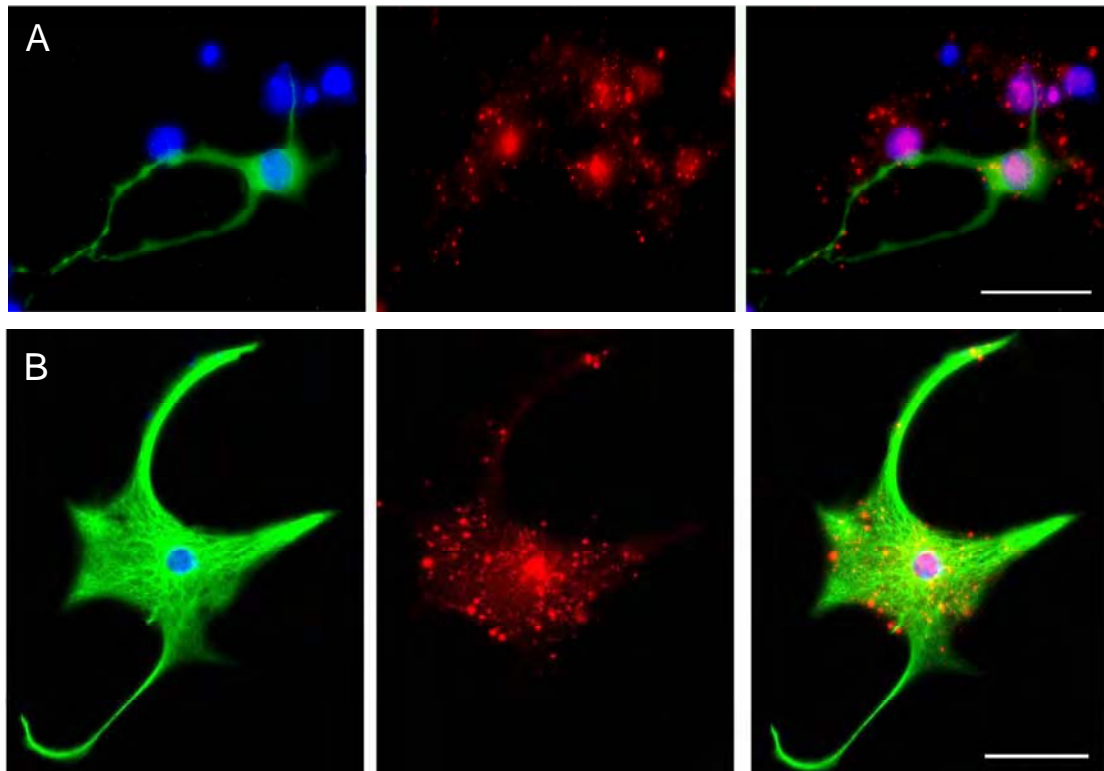


Abb. 83: Immunzytochemischer Nachweis des α_1 -Adrenozeptors in der primären Zellkultur des MnPO

Bildfolge A zeigt den immunzytochemischen Nachweis des α_1 -Adrenozeptor in Neuronen der primären Zellkultur des MnPO. Das linke Bild zeigt ein durch den Primärantikörper *monoclonal mouse-anti-MAP 2a+b* (1:600) und Sekundärantikörper *Alexa[®]488- donkey-anti-mouse IgG* (1:800) gekennzeichnetes MnPO-Neuron mit einem DAPI markierten Zellkern. Das mittlere Bild zeigt den mittels *rabbit-anti- α_1 -Adrenoceptor* (1:500) und *Cy3[™]-donkey-anti-rabbit IgG* (1:800) markierten α_1 -Adrenozeptor. Anhand der Überlagerung im rechten Bild lässt sich deutlich die Expression dieses Rezeptorsubtyps in einem MnPO-Neuron erkennen.

Bildfolge B zeigt den analogen Nachweis des α_1 -Adrenozeptor in einem MnPO-Astrozyten. Der zellcharakteristische Nachweis erfolgte mittels des Primärantikörpers *goat-anti-glia fibrillary acidic protein* (1:500) und dem Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper *Alexa[®]488- donkey-anti-goat IgG* (1: 800)

Balken entspricht 25 μ m

3.4.4. AngII responsive, nNOS-exprimierende Neurone in der MnPO-Primärkultur

Der postexperimentelle Nachweis einer zytosolischen Expression der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) in der MnPO-Primärkultur ergab, dass 10 – 15 % der Neurone nitrenger Natur waren und folglich NO als volatilen Neuromodulator benutzten. Um in Analogie zu den Ganztier-physiologischen Untersuchungen aus Kap. 3.2.3 der Frage nachzugehen, ob osmotische bzw. Volumenstimuli zu einer Aktivierung nitrenger bzw. nicht-nitrenger Neurone des MnPO führten, wurden Fura-2 beladene MnPO-Primärkulturen mit AngII (repräsentiert die osmotische Stimulation) bzw. NA (repräsentiert eine Volumenstimulation) superfundiert. Änderungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio wurden als intrazelluläre Calciumsignale aufgezeichnet.

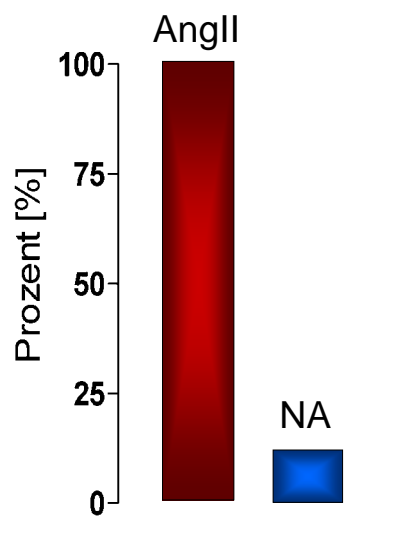


Abb. 84: Aktivierung nitrenger Neurone der MnPO-Primärkultur

Anteil derjenigen Neurone der MnPO-Primärkultur, welche (1) während Superfusionsstimulation mit Angiotensin II (AngII; 10^{-6} M/L) bzw. Noradrenalin (NA; 10^{-6} M/L) ein intrazelluläres Calciumsignal aufwiesen und (2) postexperimentell mittels Immunzytochemie als nitreng charakterisiert werden konnten. Daten sind prozentual bezogen auf die Zahlen der mit dem jeweiligen Neuromodulator getesteten, nNOS immunopositiven MnPO-Neurone.

Mittels immunzytochemischer Untersuchungen konnten in insgesamt 5 Zellpräparationen 18 nNOS immunpositive Neurone in der primären Zellkultur hinsichtlich ihres Antwortverhaltens auf Superfusionsstimulation mit Noradrenalin bzw.

Angiotensin II charakterisiert werden. Dabei konnte ermittelt werden, dass alle 11 in Kap. 3.4.1 als AngII -responsiv charakterisierten Neurone der Gruppe der nNOS positiven Zellen zuzuordnen waren, während sich lediglich bei acht der insgesamt 71 NA-responsiven Neurone das nitrege Transmittersystem nachweisen ließ (Abb. 84). Zwei der untersuchten nitregeren Neurone zeigten ein intrazelluläres Calciumsignal sowohl nach Aktivierung mit AngII als auch NA. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass (1) AngII ausschließlich nitreger Neuro-ne des MnPO aktivierte, und (2) NA in lediglich einer kleinen Population nitreger Neurone ein intrazelluläres Calciumsignal induzieren konnte, wobei diese NA-reaktiven Neurone möglicherweise einer zur AngII-responsiven Gruppe unterschiedlichen Zellpopulation zuzurechnen ist. Diese Hypothese wird durch die morphologische Beobachtung gestützt, dass nitreger AngII-responsive Neurone ausschließlich der morphologischen Gruppe bipolarer Neuronentypen zuzuordnen waren, während es sich bei den nitregeren NA-responsiven Neuro-nen der MnPO-Primärkultur ausschließlich um multipolare Neurone handelte.

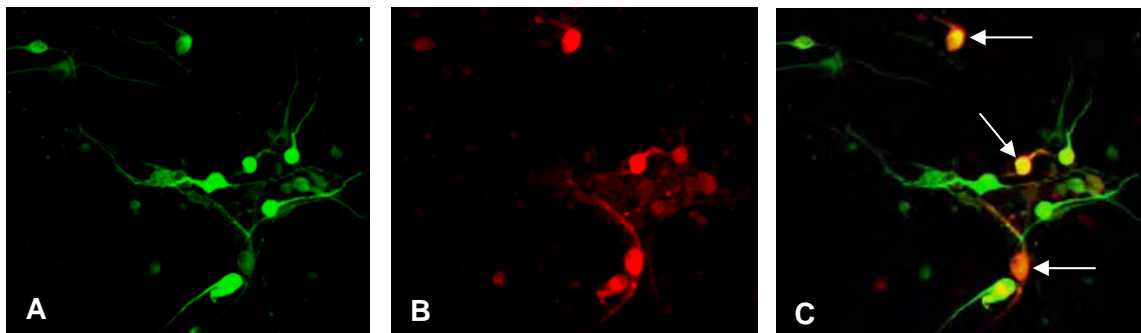


Abb. 85: Immunzytochemischer Nachweis nitreger Neurone in der MnPO-Primärkultur

Die Expression des Stickstoffmonoxid (NO) generierenden Enzyms nNOS in der primären Zellkultur zeigt die immunzytochemische Charakterisierung MnPO-intrinsischer Neurone in der MnPO-Primärkultur durch Verwendung des Primärantikörpers *monoclonal mouse-anti-MAP 2a+b* (1:600) und des Sekundärantikörpers *Alexa[®]488-donkey-anti-mouse IgG* (1:800) (A) sowie die Co-Lokalisation des zytoplasmatischen Nachweis der nNOS mittels des Primärantikörpers *rabbit-anti-nNOS* (1:1000) und des Sekundärantikörper *Cy3[™]-donkey-anti-rabbit IgG* (1:800) (B).

(C) stellt eine Überlagerung von A und B dar. Die weißen Pfeile weisen auf MAP 2a+b/nNOS-positive Neurone.

Balken entspricht 10 μ m

4. Diskussion

4.1. Neuronale Aktivierung in MnPO-Substrukturen nach Wärmeexposition, Dehydrierung und Hypovolämie

Eine Vielzahl experimenteller *in vivo* und *in vitro* Untersuchungsmethoden wie stereotaktische Läsionsstudien, elektrophysiologische Ableitungen an vitalen Gehirnschnitten und (virale) neuronale Tracingstudien zeigten eine teilweise kongruente, teilweise unterschiedliche Verteilung aktivierter hypothalamischer Neurone, die in das thermo-, osmo- und Volumen-regulatorische Netzwerk der Säugetiere eingebunden sind. In den letzten Jahren bediente man sich zusätzlich des Nachweises der Expression und nukleären Translokation intrazellulärer Transkriptionsfaktoren wie z.B. Fos, Jun oder C/EBP als Marker für die Charakterisierung neuronaler Aktivierung (Morgan & Curran, 1989; Sagar *et al.*, 1988). Der histochemische Nachweis dieser „immediate-early genes“ dient(e) zur Aufklärung der Zytoarchitektur des hypothalamischen Kontrollsystems der Osmo- und Thermoregulation (Rowland, 1998).

Um die differentielle Verteilung aktivierter Neurone in hypothalamischen Strukturen wie dem MnPO als wichtiger Relais-Station für afferente thermische, osmotische bzw. Volumensignale untersuchen zu können, mussten für die Beeinflussung der jeweiligen Regelkreise möglichst ideale Stimulationsbedingungen ermittelt werden. So führte der 24-stündige Entzug des Trinkwassers bei signifikanter Erhöhung der Plasmaosmolalität lediglich zu einer marginalen Reduktion des EZF-Volumens bei unveränderter Körpertemperatur und deren circadianen Rhythmik. Milde Wärmeexposition (30°C) der Versuchstiere für zwei Tage mit Zugang zu Trinkwasser bedingte eine Zunahme der KT bei nahezu unveränderten Parametern der EZF. Die hyperonkotische i.p. Behandlung mit PEG schließlich verursachte eine markante Zunahme des Hkt-Wertes, wie schon von Ueta *et al.* (1998) beschrieben, bei unveränderter Plasmaosmolalität und auch KT.

Anders als diese „reinen“ Stimulationsbedingungen für die jeweilige Aktivierung des osmo-, thermo- und Volumenregulatorischen Systems führte die 48-stündige Exposition einer RT von 33°C hingegen zu einer signifikanten Erhöhung der

Plasmatonizität, einer Reduktion des EZF Volumens sowie einem signifikanten Anstieg der KT mit partiellem Verlust der circadianen Rhythmik für KT, lokomotorische Aktivität und Trinkverhalten. Dies steht im Kontrast zu durchgeführten Studien von Patronas *et al.* (1998) an Sabra-Ratten, bei denen eine vergleichbare Wärmeexposition zu keiner Veränderung der Plasmaosmolalität, des Blutvolumens sowie der Plasmakonzentrationen relevanter Hormone wie AVP- und AngII führte. Lediglich die KT und die diurnale Trinkwasseraufnahme zeigten sich erhöht. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der Wahl der Versuchstiere. Patronas *et al.* (1998) und Horowitz *et al.* (1999) verwendeten Ratten des hitzetoleranten Sabra-Stammes (Ben-Ishay *et al.*, 1980; Lutsky *et al.*, 1984), während in der vorliegenden Untersuchung Wistar-Ratten gewählt wurden. Die Sabra-Ratte stellt daher ein geeignetes Tiermodell für die Erforschung thermoadaptiver Prozesse dar (Horowitz & Meiri, 1985; Horowitz *et al.*, 1988; Schwimmer *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit gelang es nun, durch die Abgrenzung eindeutig charakterisierter Stimuli differenzierte neuronale Aktivierungsmuster etwa nach Dehydratation, intravasaler Hypovolämie oder Wärmestimulation zu erzielen. So führte schon eine geringfügige Erhöhung der EZF-Tonizität zu einer spezifischen, ausgeprägten Aktivierung von Neuronen in allen drei Substrukturen des MnPO, bei zentralisierter Lokalisation Fos-immunpositiver Zellen. Die durch eine milde extrazelluläre Dehydratation ausgelöste Expression des c-fos Gens konnte ebenfalls von zahlreichen Arbeitsgruppen im innerhalb der BHS gelegenen MnPO nachgewiesen werden, wie schon in der Einleitung verdeutlicht (Arnhold *et al.*, 2007; Fenelon *et al.*, 1993; Hamamura *et al.*, 1992; McKinley *et al.*, 1994; Morien *et al.*, 1999; Sladek & Olschowka, 1994; Santana *et al.*, 2007; Xu & Herbert, 1996). Eine differenzierte Betrachtung hinsichtlich der Aktivierung des MnPO durch erhöhte extrazelluläre Tonizität gelang schon früher durch die Untersuchung der einzelnen Substrukturen des MnPO. So beschrieben McKinley *et al.* (1994) nach einem 24-stündigen Wasserentzug eine homogene Fos-Expression im aMnPO, dMnPO und vMnPO. Auch Patronas *et al.* (1998) konnten bei vergleichbarem Versuchsansatz an Sabra-Ratten keine auffälligen Unterschiede in der Aktivierung der Substrukturen des MnPO darstellen. Interessanterweise zeigten alle Einheiten des MnPO sowie das OVLT in einer Studie an

Ratten mit 24-stündigem Trinkwasserentzug und nachfolgender 22-stündiger Rehydrierung eine persistierende nukleäre Fos- und FosB-Translokation in zahlreichen Zellen, wohingegen es zu einer vollständigen Reversion im Bereich des SON und PVN kam; ein Erklärungsansatz wurde von den Autoren nicht geboten (Ji *et al.*, 2004).

Hinsichtlich des außerhalb der BHS gelegenen, und mit dem MnPO assoziierten OVLT ergab sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nach 24-stündiger Dehydrierung eine relativ homogene Verteilung nukleär translozierter Fos-Signale sowohl in der *dorsal cap* als auch dem zentralen Anteil des OVLT. Während im OVLT die maximale Anzahl Fos-positiver Zellen bereits nach 16 Stunden der Stimulation erreicht wurde, schienen Neurone des SFO als weiterem sCVO der *Lamina terminalis* erst später aktiviert zu werden (Morien *et al.*, 1999). McKinley und Mitarbeiter (1994) beschrieben für das OVLT lediglich in der *dorsal cap* markierte Neurone, während die vaskuläre, zentrale Zone weitestgehend unmarkiert blieb. Eine vergleichbare Verteilung Fos-positiver Zellen konnte nach systemischer Applikation einer hypertonen NaCl-Lösung für die Ratte erzielt werden (Denton *et al.*, 1996). Dehydrierung führte in Strukturen, die nicht primär an der zentralen Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes beteiligt sind, zu keiner nennenswerten Änderung der Fos-Expression. Wie auch von Gerstberger *et al.* (2001) beschrieben, konnte keine Aktivierung thermorezeptiver Strukturen wie z.B. des LS, der VMPO, MPA oder LHA verzeichnet werden.

Nach Induktion einer isotonen, normotensiven Hypovolämie durch hyperonkotische PEG-Applikation i.p. ließen sich vergleichbar hohe Gesamtzahlen Fos-positiver Zellen sowohl im aMnPO, dMnPO als auch vMnPO identifizieren. Dabei fanden sich durch PEG-Behandlung aktivierte Zellen vorrangig in medio-ventralen Zonen aller drei Substrukturen des MnPO, eine *dato* noch nicht beschriebene Verteilung Fos-positiver Neurone. In wenigen, früheren Arbeiten über die Volumen-regulatorische Bedeutung der *Lamina terminalis* erbrachten generelle Fos-Analysen nach PEG-Behandlung erste Hinweise auf neuronale Aktivierung in SFO, OVLT sowie MnPO der Ratte (Han & Rowland, 1995; Rowland *et al.*, 1996). Die starke Fos-Markierung aller Anteile des MnPO in der

vorliegenden Arbeit stimmt mit der Annahme überein, dass die AV3V Region und mit ihr der MnPO eine bedeutende rezeptive und integrative Struktur des Hypothalamus darstellt, welche zentrale neuronale Antworten bei extrazellulärer Hypovolämie koordiniert (Gerstberger *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003). Die Reduktion des intravasalen Blutvolumens um 20 - 30 % des Gesamtbluts durch sequentielle Blutentnahmen stellte bei Versuchstieren wie der Ratte in zahlreichen Untersuchungen eine gängige Methode zur Erzeugung einer Hypovolämie dar, verursachte in den meisten Studien jedoch einen signifikanten Abfall des arteriellen Blutdrucks (Badoer *et al.*, 1992, 1993; Hartley *et al.*, 2004; Krukoff *et al.*, 1995). Die nachfolgende Induktion des Barorezeptorreflexes war dabei im Wesentlichen ursächlich an der Aktivierung medullärer, teilweise auch hypothalamischer Neurone des PVN oder SON, nicht jedoch des MnPO, beteiligt. Folglich wurde in diesen Studien ein Aktivierungsmuster vergleichbar dem bei isovolämischem Blutdruckabfall beschrieben (Dampney & Horiuchi, 2003; Xie *et al.*, 2000). Wenngleich nicht in der vorliegenden Arbeit selbst nachgewiesen, so wird die durch PEG hervorgerufene, intravasale Hypovolämie als nicht-hypotensiv beschrieben (Curtis *et al.*, 2002; Rowland *et al.*, 1996). In anderen experimentellen Untersuchungsansätzen zur Klärung neuronaler Aktivierungsmuster unter Bedingungen einer Hypovolämie wurde an wachen, chronisch instrumentierten Kaninchen durch das Aufblasen einer Manschette um die *Vena cava* eine akut-zentrale Hypovolämie bei unverändertem arteriellen Blutdruck nachgeahmt. Dies hatte eine ausgeprägte Aktivierung von Neuronen aller Strukturen der *Lamina terminalis*, also OVLT, SFO und MnPO zur Folge (Potts *et al.*, 2000).

Smith und Day (1995) beobachteten nach PEG-Induktion einer isotonen, intravasalen Hypovolämie eine homogene Fos-Expression auch für die sensorischen CVOs der *Lamina terminalis*, SFO und OVLT. Für das OVLT ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine Fokussierung Fos-positiver Neurone im zentralen Bereich des OVLT, was darauf hinweist, dass die zwei Substrukturen des OVLT - *dorsal cap* und zentrale Komponente – unterschiedlich an der Perzeption „reiner“ osmotischer und Volumen-Signale beteiligt sind.

Wärmeexposition bis hin zu Hitzestress, Kälteexposition und pharmakologische Induktion von Fieber sind experimentelle Möglichkeiten, um medulläre oder hypothalamische Strukturen und/oder deren Neurotransmittersysteme im Rahmen der zentralen Thermoregulation zu untersuchen. So konnte eine Zunahme zellulärer Aktivierung um das 5-10 fache in thermoresponsiven sowie –perzeptiven Kerngebieten wie MPA, VMPO, LHA und auch MnPO nach 48-stündiger Wärmeexposition nachgewiesen werden (Gerstberger *et al.*, 2001). Bei akutem Hitzestress (2 - 3 h bei 33 – 36°C) zeigte sich eine Fos-Markierung in der MPA, LPA und dem LS einhergehend mit einem Anstieg der Körperkerntemperatur. Dabei schien die antero- und ventromediale MPA als das am stärksten markierte Areal (Kiyohara *et al.*, 1995), wenngleich Scammel *et al.* (1993) in einem Satz erwähnen, dass „der MnPO die dichtest markierte Struktur des Diencephalon darstellte, mit zahlreichen Fos-immunreaktiven Zellkernen ober- und unterhalb der vorderen Kommissur“. Schon eine kurze Wärmeexposition (33 - 37°C) für lediglich 30 - 60 min vermochte es, im MnPO des Rattenhypothalamus zahlreiche Neurone zu aktivieren (Bachtell *et al.*, 2003; Bratincsak & Palkovits, 2004; Santana *et al.*, 2007). In vorangegangenen Studien zeigte sich eine gleichmäßige Aktivierung aller drei Substrukturen des MnPO bei längerfristiger Wärmeexposition (Patronas *et al.*, 1998; Scammell *et al.*, 1993). Vergleicht man dies mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, so lässt sich ein differenzierteres Verteilungsmuster erkennen. Sowohl bei milder Wärmeeinwirkung (30°C) als auch moderatem Hitzestress (33°C) für jeweils 48 Stunden ergab sich eine signifikant stärkere Aktivierung des aMnPO im Vergleich mit vMnPO und dMnPO. Im Bereich des dMnPO zeigten vor allem Neurone in dessen lateralen Zonen eine nukleäre Fos-Translokation, während Fos-immunpositive Zellkerne des vMnPO vermehrt ventrikelnah lokalisiert waren.

Auf Ebene der CVOs wiesen Patronas *et al.* (1998) bei Sabra-Ratten lediglich eine moderate Aktivierung der *dorsal cap* des OVLT nach. Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Wistar-Ratte mit reduzierter Hitzetoleranz hingegen führten sowohl milde Wärmeexposition als auch Hitzestress zu einer deutlichen Aktivierung von Neuronen der *dorsal cap* des OVLT. Die bei der hitzestressierten Versuchstiergruppe zusätzlich verzeichnete, nukleäre Fos-Translokation in der zentralen OVLT-Zone war offensichtlich auf die mit der

Thermostimulation einhergehende Hyperosmolalität der EZF bei gleichzeitiger intravasaler Hypovolämie zurückzuführen. Andere Arbeitsgruppen konnten nach zweitägiger Wärmeeinwirkung keine Fos-Expression in den sensorischen CVOs (OVLT und SFO) demonstrieren (Kiyohara *et al.*, 1995; Scammell *et al.*, 1993).

4.2. Aktivierung nitrerger Neurone in den Substrukturen des MnPO nach Wärmeexposition, Dehydrierung und Hypovolämie

Da die Neurone der sCVOs der *Lamina terminalis* und der magnozellularen Kerngebiete des PVN und SON hauptsächlich durch osmotische und Volumenstimuli, die Neurone der POA, des MnPO und der LHA durch thermische Reize aktiviert werden, stellt sich die Frage nach den an Perzeption und Interaktion beider Regelsysteme vor allem im MnPO beteiligten Neurotransmittersystemen. Dabei scheint gesichert, dass neuronal synthetisiertes NO eine wichtige Rolle als volatiler Neuromodulator im Rahmen der zentralen Osmo- und Thermoregulation spielt (Gerstberger, 1999; Gerstberger *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2002). Neuronale NOS als Schlüsselenzym der NO-Biosynthese wird in allen an der Perzeption sowie Verarbeitung osmo- sowie thermoregulatorischer Signale beteiligten Kerngebieten des Hypothalamus exprimiert (Bhat *et al.*, 1995; Iwase *et al.*, 1998; Jurzak *et al.*, 1994; Krukoff, 1999; Liu *et al.*, 1998; Maqbool, 1995; Rodrigo *et al.*, 1994). Dies konnte durch die aktuellen immunhistochemischen Untersuchungen reproduziert werden; so erwiesen sich zahlreiche Neurone des OVLT, SFO, MnPO, PVN und SON, sowie der POA und LHA als nitrerg.

Mehrere Autorengruppen haben die mögliche up- oder down-Regulation der im Wesentlichen konstitutiv exprimierten nNOS durch Stimulation des thermoosmo- oder Volumen-regulatorischen Regelkreises experimentell untersucht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte somit unter den Versuchsbedingungen erhöhter Umgebungstemperatur, extrazellulärer Dehydratation oder isotoner, intravasaler Hypovolämie eine quantitative Erfassung nNOS-immunpositiver Neurone in MnPO und OVLT. Wie auch von Patronas *et al.* (1998) anhand eines enzymhistochemischen Nachweises der nNOS-intrinsischen NADPH-Diaphorase Aktivität für die Sabra-Ratte publiziert, ergab sich für keine der drei Substruk-

turen des MnPO sowie des OVLT eine stimulationsbedingte Beeinflussung der Anzahl nNOS-positiver Zellen. Auf der andere Seite bewirkte sowohl Wärmeexposition als auch Dehydratation der EZF bei Sabra-Ratten sowohl eine signifikant verstärkte NADPH-Diaphorase Aktivität im Bereich des gesamten MnPO, als auch Bindung des Radioliganden [³H]Nitro-L-Arginin als funktionelles Maß für eine gesteigerte Enzymaktivität (Gerstberger *et al.*, 2001). Zusätzlich war dies für PVN und SFO bei osmotischer, VMPO und MPA bei thermischer Stimulation nachweisbar. Unter Bedingungen einer ausgeprägten Dehydratation der EZF bzw. akuter oder chronischer oraler Salzaufnahme konnte damit übereinstimmend ein Anstieg in der Expression und Translation der nNOS-spezifischen mRNA in den magnozellulären Kerngebieten sowie dem aMnPO des Hypothalamus demonstriert werden (Ciriello *et al.*, 1996; Kadowaki *et al.*, 1994; Villar *et al.*, 1994), wobei in diesen Studien auch die reine Anzahl NADPH-Diaphorase positiver Neurone im PVN, SON, MnPO und den beiden sensorischen CVOs der *Lamina terminalis* zunahm (Ciriello *et al.*, 1996; Ueta *et al.*, 1995). Im OVLT ergab sich ein Anstieg der NADPH-Diaphorase Aktivität vor allem in der zentralen, vaskulären Komponente (Ciriello *et al.*, 1996).

Osmo- und thermoregulatorische Stimuli induzieren somit ein spezifisches Verteilungsmuster von nukleär lokalisierten Fos-Signalen und erhöhter nNOS-Aktivität in osmo- und thermoregulatorischen Strukturen des Hypothalamus. Dies bedingt, dass die neuronale Aktivierung mit Veränderungen der nNOS-Aktivität assoziiert ist. Kombinierte NADPH-Diaphorase- und Fos-Immunzytochemie dienten zur Identifizierung aktivierter nitrender Neurone (Krukoff & Khalili, 1997). Im Rahmen des kombinierten Nachweises von nNOS und Fos mittels indirekter Immunfluoreszenz in dieser Arbeit zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen thermischer und osmotischer bzw. Volumen-Stimulation sowohl im MnPO als auch im OVLT. Nach Wärmeexposition und Hitzestress konnte lediglich im aMnPO eine signifikante Zahl aktivierter Neurone der Population nitrender Neurone zugeordnet werden, was wiederum für eine besondere Bedeutung des aMnPO bei der Perzeption thermischer Signale und die Involvierung von NO spricht. Anders stellte sich das nitrende Aktivierungsmuster nach 24-stündiger Dehydrierung und Volumendepletion dar. In allen drei Substrukturen des MnPO konnten zwischen 17 - 26% der Fos-exprimierenden

Zellen nach Dehydrierung und 5 - 10 % nach Volumendepletion als nitrerge Neurone identifiziert werden. Ähnlich verhielt es sich beim OVLT. Bei 50 % der aktivierten Zellen konnte nach Volumendepletion nNOS immunhistochemisch nachgewiesen werden. Auffällig war die fast ausschließlich zentralisierte Lokalisation der doppelt-markierten Neurone im vaskularisierten Teil des OVLT. Nach 24-stündiger Dehydrierung konnten 24 % der aktivierten Neurone der nitrergen Neuronenpopulation zugeordnet werden. Dies spricht für eine herausragende Bedeutung des nitrergen Transmittersystems v.a. in der Perzeption und/oder Verarbeitung osmo- und Volumen-relevanter Signale in MnPO und OVLT. Diese Ergebnisse decken sich mit denen vorausgegangener Studien. Nach Trinkwasserentzug mit oder ohne kombinierter Wärmeexposition wurde Fos in 40 % bzw. 30 % der nitrergen Neurone des OVLT respektive SFO bei Sabra-Ratten nukleär transloziert. Insgesamt 15 % der MnPO-intrinsischen nitrergen Neurone zeigten eine Co-Lokalisation mit dem Fos-Protein (Gerstberger *et al.*, 2001). Eine hohe Co-Expression von bis zu 60 % konnte in den magnozellulären Neuronen des PVN und SON nachgewiesen werden (Ying *et al.*, 1996). Die Bedeutung spezifischer Aktivierung nitrerger Neurone für die zentrale Kontrolle der EZF-Homöostase bzw. des Kreislaufsystems zeigte sich in der Fos-Expression in 30 - 50 % aller nitrergen Neurone des parvo- und magnozellulären PVN, und zu einem geringeren Anteil des SON, SFO und MnPO nach Blutverlust- oder Nitroprussid (NO-Donor) -induzierter Hypotension (Petrov *et al.*, 1995; Tassorelli & Joseph, 1995). Vor allem die Fos-Induktion in nitrergen PVN-intrinsischen Neuronen mit Projektionen zum NTS oder der kaudalen ventrolateralen Medulla charakterisierten NO als wichtigen Modulator des hypothalamo-medullären Kontrollsystems im Rahmen der kardiovaskulären Homöostase (Krukoff & Khalili, 1997).

Auch die moderate Aktivierung nitrerger Neurone nach thermischer Stimulation in der vorliegenden Arbeit stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen überein, bei denen weniger als 8 % aller nNOS exprimierenden Zellen der MPA bzw. VMPO und weniger als 3 % aller nitrergen Neurone anderer hypothalamischer Strukturen eine Fos-Expression aufwiesen (Gerstberger *et al.*, 2001). Nach thermischer Stimulation ließ sich somit zwar nur eine marginale Co-Lokalisation nNOS- und Fos-immunpositiver Markierung im

Zytosol (nNOS) sowie Kern (Fos) MnPO-intrinsischer Neurone aufzeigen; in vielen Fällen lag jedoch eine eindeutige Co-Distribution von nNOS und Fos vor. So konnten nach Wärmeexposition Fos-exprimierende Neurone sowohl im MnPO als auch im MPA-VMPO Komplex häufig in direkter „Nachbarschaft“ zu nitrergen Neuronen markiert werden. Dies führt zu der Hypothese, dass thermisch induziertes NO zu einer Fos-Expression (= Aktivierung) umliegender Zellen führte. Mikroskopische Untersuchungen beschreiben netzartige nitrerge Nervenfasergeflechte in direktem Kontakt zu Fos-positiven, MnPO-intrinsischen Neuronen nach Wärmeexposition (Gerstberger *et al.*, 2001).

4.3. Aktivierung nitrerger Neurone nach Dehydrierung in den Substrukturen des MnPO mit efferenter neuraler Projektion in den pPVN

Aus den bisher erzielten Ergebnissen resultierte die Frage, ob und - wenn ja - wieviele der aktivierten (nicht-)nitrergen Neurone im OVLT und vor allem in den Substrukturen des MnPO efferente Projektionsbahnen zum parvozellulären Anteil des PVN aufweisen. Der pPVN repräsentiert das wichtigste Kerngebiet des Hypothalamus für die Interaktion afferenter Informationen im Rahmen der Kontrolle mehrerer homöostatischer Systeme etwa zur Konstanthaltung von Körpertemperatur, Salz- und Wasserhaushalt, Futteraufnahme, circadianer Rhythmik oder Schlaf. *Dato* liegen bezüglich dieser Projektionsbahnen nur limitierte Informationen vor (Stocker & Toney, 2005), wohingegen über efferente Verbindungen des MnPO zum PVN allgemein zahlreiche Veröffentlichungen existieren (Dzau *et al.*, 1986; Saper & Levinsohn, 1983; Stocker & Toney, 2005; Tanaka, 2002; Ushakov *et al.*, 2006).

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die stereotaktische Tracer-Technik eingesetzt, um neuronale Konnektivitäten speziell vom MnPO zum pPVN zu untersuchen. Als retrograd wandernder, in den pPVN applizierter neuronaler Tracer reichert sich der in dieser Arbeit benutzte, fluoreszierende, divalent kationische Farbstoff True blue (TB) im Zytoplasma des jeweiligen Zellkörper an und verbleibt dort, ohne anterograd wieder abtransportiert zu werden (Haase & Payne, 1990; Wyss *et al.*, 1990). Die für das Tier untoxische Markierung bleibt

stabil und behindert weder das normale Wachstum noch die Funktion der markierten Neurone (Garrett *et al.*, 1991). Welche Form des retrograden Transportes der Tracer TB nutzt, ist zurzeit nicht in allen Einzellheiten bekannt, da TB sowohl von geschädigten als auch nicht geschädigten Axonendigungen aufgenommen wird. Hinweise auf einen transneuronalen Transport des Farbstoffes existieren nicht (Sawchenko & Swanson, 1981). Um die Effizienz von TB beurteilen zu können, wurden Vergleichstudien mit anderen Tracersubstanzen durchgeführt. Als Testsystem nutzten Sawchenko *et al.* (1981) die Projektionen vom PVN zum Rückenmark. Es zeigte sich, dass nach vergleichbaren Injektionsmengen in das Rückenmark in einem genau definierten Gebiet des PVN prozentual mehr Zellen mit True blue (88 %) markiert waren, als nach vergleichbaren Injektionen mit Bisbenzimid (58 %) oder Meerrettichperoxidase (24 %).

Nach Mikroapplikation des retrograden neuronalen Tracers TB in den parvocellulären Anteil des PVN konnte eine Vielzahl von neuronalen Projektionsgebieten mit unterschiedlichen Ausprägungen dargestellt werden. Es konnten sowohl extrahypothalamische Strukturen wie der *Cortex piriformis* und das *Cingulum*, septale Strukturen (HDB, LSI, LSV, VDB etc.), Komponenten der Amygdala (BSTM, AcbSH etc.) und des Hirnstamms (AP, NTS), als auch hypothalamische Kerngebiete der periventriculären (MnPO, SON), der medialen (MPA, VMPO etc.) und der lateralen Zone (LHA etc.) sowie sensorische CVOs der *Lamina terminalis* (OVLT, SFO) markiert werden. Bei den identifizierten afferenten Projektionen des pPVN handelte es sich um direkte, monosynaptische Konnektivitäten, da TB im Gegensatz zu viralen Tracern, wie schon erwähnt, nicht in der Lage ist, Synapsen zu überspringen. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren neuroanatomischen Untersuchungen (Kawano & Masuko, 2006; Sawchenko & Swanson, 1983; Stocker & Toney, 2005; Weiss *et al.*, 1989; Zardetto-Smith & Johnson, 1995). Die Vielzahl der getrackten Kerngebiete spiegelt die Komplexität der afferenten Verschaltung auf den pPVN wider, mit Signalen neurosekretorischer, homöostatischer, emotionaler und rationaler Relevanz.

Eine Besonderheit wies vor allem die Ausprägung der Markierung von MnPO und OVLT auf. Im Gegensatz zu den meisten anderen afferenten Projektionen des pPVN, zeigte sich neben der stark ausgeprägten ipsilateralen auch eine limitierte kontralaterale Markierung projizierender Neurone. Die bisher als uniforme geltenden Strukturen (MnPO und OVLT) scheinen ebenfalls bilaterale Projektionen zum pPVN auszubilden. Im Bezug auf den MnPO wurde diese These von Stocker und Toney (2005) bestätigt. Durch elektrophysiologische Untersuchungen an in den PVN projizierenden MnPO-Neuronen demonstrierten die Autoren, dass die 90 % dieser Neurone lediglich unilateral retrograd erregbar waren, 10 % jedoch bilateral mittels Bildung von Axonkollateralen in den PVN projizierten. Ähnliche Beobachtungen wurden bei neuronalen Projektionen des MnPO in den SON gemacht (Renaud, 1993). Weiss & Hatton (1990) beschrieben ebenfalls, dass einige MnPO-intrinsische Neurone Kollaterale sowohl in den PVN als auch in den SON entsenden können.

Um bestehende Subpopulationen im OVLT und MnPO genauer im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizieren zu können wurden pPVN- mikroapplizierte Tiere einem 24-stündigen Trinkwasserentzug ausgesetzt und die Fos-Expression nitrerger MnPO- und OVLT-Neurone mit Projektionen zum pPVN untersucht. Im aMnPO zeigte sich eine relativ homogene Verteilung. Ebensoviel nitrerge als auch nicht-nitrerge Neurone wiesen neben der Fos-Expression eine Markierung durch True blue auf. Dies lässt vermuten, dass ein weiteres Transmittersystem an der neuralen Kommunikation mit dem pPVN involviert ist. Neben dem angiotensinergen und noradrenergen konnte in MnPO-intrinsischen Neuronen mittels immunzytochemischen Untersuchungen und in situ-Hybridisierung eine Vielzahl von Neurotransmittern oder deren Markern nachgewiesen werden, wie z.B. Neurotensin, Met-Enkephalin, Substanz P, GABA (GAD 65 und 67 mRNA), Glutamat (vesikulärer Glutamat-Transporter-2 mRNA) und die Cholinacetyltransferase (ChAT) (Grob *et al.*, 2004; Harikai *et al.*, 2003; Westerhaus, 1999). Der Versuch des kombinierten immunhistochemischen Nachweises von GABA, NA, ChAT oder Glutamat mit Fos im Rahmen dieser Arbeit führte im MnPO zu keinem hinreichenden Erfolg (Daten daher nicht in der Arbeit enthalten). Im dMnPO zeigte sich ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung true blue- markierter nitrerger und nicht-nitrerger

Neurone, was ebenfalls ein zweites Transmittersystem vermuten lässt. Auffällig war die relativ hohe Anzahl nitrerger Neurone mit einem true blue-label. Dies deutet auf unterschiedliche nitrerge Neuronenpopulation mit efferenten Projektionen zum pPVN hin, welche in geringerer Anzahl ebenfalls im aMnPO und in gleicher Anzahl im vMnPO zu beobachten waren. Durch einen rein osmotischen Stimulus werden diese nitrergen Neurone nicht aktiviert. Da NO als Neuromodulator/Neurotransmitter in der intrahypothalamische Regulation des kardiovaskulären Systems fungiert ist es möglich, dass diese nitrergen Neuronenpopulation an der zentralen Kontrolle der EZF-Homöostase beteiligt sind. Im vMnPO fällt ein signifikanter Anstieg der nNOS/Fos/true blue markierten Neurone auf, welche einem prozentualen Anteil von 60 % der nNOS/Fos-positiven Neurone entsprach. Hieraus ergibt sich eine besondere Bedeutung des nitrergen Systems des vMnPO auf die neurosekretorische Aktivierung des PVN. Ob diese Neurone Kollateralen zum SON besitzen, wäre in weiteren Untersuchungen abzuklären. Neuroanatomische Studien von Kawano und Masuko (1993, 2000) führten zu der Annahme, dass Neurone des aMnPO und dMnPO hauptsächlich zum SFO, die des vMnPO zum PVN projizieren. Diese These kann von den vorliegenden Ergebnissen nur teilweise unterstützt werden. Auffällig ist die hohe Fos-Expression nitrerger Neurone im aMnPO und dMnPO ohne Projektionen zum pPVN. Unterstellt man diesen Neuronen potentielle Projektionen zum SFO, besteht die Möglichkeit, dass diese Aktivierung durch die Interaktion mit dem angiotensinergen System des SFO zustande kommt. Die Interaktion des angiotensinergen und nitrergen Systems in der *Lamina terminalis* v.a. in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes ist hinlänglich bekannt (Alm *et al.*, 1997; Krizanova *et al.*, 2001). Bereits 1984 identifizierten Lindt *et al.* angiotensinerge Projektionen vom SFO zum MnPO. So wiesen Guilhaume und Corrêa (2001) eine ausgeprägte Kollokalisierung der NADPH-Diaphorase und AngII- Bindungsstellen in der gesamten *Lamina terminalis* v.a. aber im SFO, OVLT und MnPO nach. Desweiteren bewirkten neurale Läsionen des SFO eine Reduktion von MnPO-intrinsischen AngII-spezifischen Bindungsstellen um 48 %. Barth & Gerstberger (1999) registrierten während einer Dehydrierung im SFO eine Up-Regulation der Angiotensinogen und AT_{1A}-Rezeptor mRNA. Weiterhin induziert AngII über AT₁-Rezeptoren Fos v.a. im MnPO, SFO und PVN (Herbert *et al.*, 1992; Lebrun

et al., 1995, McKinley *et al.*, 1994, 1995; Rowland *et al.*, 1994). Es ist also vorstellbar, dass die im Rahmen der osmotischen Stimulation aktivierten nitrergen Neurone des aMnPO und dMnPO z.B. an der Regulation der AT_{1A}-Rezeptor-Expression des SFO beteiligt sind, oder integrierte osmotische Informationen an das SFO übermitteln. Weiterhin kann die Aktivierung dieser nitrergen Neurone auch durch MnPO-intrinsische Informationsübermittlung zwischen den drei MnPO Substrukturen induziert werden. Intrinsische Konnektivitäten der Substrukturen des MnPO sind bekannt (Uschakov *et al.*, 2006). Dies würde die integrative Funktion des MnPO als Relais-Station des Hypothalamus deutlich hervorheben. Die These, dass v.a. der vMnPO in den pPVN projiziert kann nicht unterstützt werden. Anhand der Zahl der true blue-positiven Neurone in den Substrukturen des MnPO lässt sich eine gleich verteilte Intensität der projizierenden Neurone feststellen. Im OVLT wiesen lediglich 1,4 % der TB-positiven Neurone eine Kolokalisation mit nNos und Fos auf, weshalb vermutet werden muss, dass dem nitrergen System im Hinblick auf die neuronale Kommunikation mit dem pPVN im Rahmen der Osmoregulation keine maßgebliche Bedeutung zuzuweisen ist.

4.4. Calciumabhängige intrazelluläre Signaltransduktion durch AngII und NA in Neuronen/Astrozyten des MnPO

4.4.1. Calcium als intrazellulärer Botenstoff

Calcium hat für die unterschiedlichsten Körperfunktionen eine herausragende biologische Bedeutung. So ist es unter anderem essentiell für die Muskelkontraktion, die Zellteilung, den Zilienschlag sowie die Knochenbildung. Damit Calcium als intrazellulärer Botenstoff agieren kann, bedarf es einer niedrigen Ca²⁺-Konzentration im Zytosol der Zelle, welche in jeder Zelle bei $\leq 10^{-7}$ M/L, wogegen die Konzentration in der Extrazellulärflüssigkeit, im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern und in den Mitochondrien bei $\approx 10^{-3}$ M/L liegt (Gryniewicz *et al.*, 1985). Somit besteht ein deutlicher Konzentrationsgradient zwischen dem Extra- und Intrazellulärraum einerseits, und dem Zytosol und den intrazellulären Kompartimenten ER, Zellkern und Mitochondrien andererseits (Johnson, 2001). Extrazelluläres Calcium kann über spannungs-

und rezeptorabhängige Kanäle ins Zytosol gelangen. In Nervenzellen führt eine durch ein Aktionspotential induzierte Depolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Zellmembran. Es kommt zu einem Calcium-Einstrom in die Nervenendigung, welcher die Sekretion von Neurotransmittern initiiert. Rezeptorabhängige Kanäle können entweder direkt über einen Liganden (ligandengesteuerter Ca^{2+} -Kanal), oder indirekt über eine 2nd-messenger Kaskade nach Aktivierung eines G-Protein- gekoppelten Rezeptors (GPCR) (Lammers, 2003). GPCR können außerdem über den 2nd-messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) eine Freisetzung von Calcium aus dem ER bewirken. Hierbei bindet ein Ligand an einen GPCR, welcher dann die Phospholipase C- β aktiviert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG). Durch IP_3 wird die Rezeptoraktivierung an die Calciumfreisetzung aus dem ER gekoppelt, da IP_3 an Calciumkanäle der ER-Membran bindet und somit Calcium freisetzt. Der zytosolische Calciumanstieg und DAG aktivieren eine calciumabhängige Proteinkinase C (PKC), welche Proteine der Zielzelle (z.B. Ionenkanäle) phosphoryliert (Johnson, 2001). IP_3 -vermittelte Calcium-Rekrutierung aus dem ER kann auch nach Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase erfolgen (Lammers, 2003). Um den Calcium-Konzentrationsgradienten ruhender Zellen aufrechtzuerhalten verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen. In allen eukaryotischen Zellen befinden sich Ca^{2+} -ATPasen in der Zellmembran, welche Calcium aus der Zelle pumpen. Nerven- und Muskelzellen exprimieren einen zusätzlichen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, welcher den Ca^{2+} - Efflux an einen Na^+ -Influx koppelt. Eine Ca^{2+} -ATPase in der Membran des ER ermöglicht die Aufnahme großer Ca^{2+} -Mengen aus dem Zytosol entgegen des hohen Konzentrationsgradienten.

4.4.2. AngII induzierte Calciumsignale

Hinsichtlich der hypothalamischen Kontrolle des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes stellt AngII als eine biologisch aktive Komponente des RAS das am besten untersuchte Hormon bzw. Neuropeptid dar. Zirkulierendes AngII führt nach Interaktion mit den in der *Lamina terminalis* lokalisierten sensorischen CVOs SFO und OVLT über zum Teil angiotensinerge Efferenzen

zum MnPO letztendlich zur Konstanthaltung des Volumens als auch der Osmolalität des extrazellulären Flüssigkeitskompartiments (Reid, 1984). In den Kerngebieten der *Lamina terminalis* wurden angiotensinerge Rezeptoren mit Hilfe autoradiographischer (Bai and Renaud, 1998; Shigematsu *et al.*, 1986; Plunkett *et al.*, 1987; Tsutsumi *et al.*, 1991; Tsutsumi and Saavedra, 1992;) und elektrophysiologischer (Ferguson, 1988; Ferguson and Bains, 1997; Rauch and Schmid, 1999; Sayer *et al.*, 1984; Tanaka *et al.*, 1993;) Methoden lokalisiert und funktionell charakterisiert. Unter Verwendung spezifischer Liganden wurde dabei die ausschließliche Präsenz des AT₁-Rezeptorsubtyps in diesen Kerngebieten demonstriert (McKinley *et al.* 1999; Millan *et al.*, 1991; Tsutsumi *et al.*, 1991), wobei dem AT_{1A}-Rezeptor eine besondere Bedeutung in der Osmoregulation nachgewiesen wurde (Bamshad *et al.* 1999, Lenkei *et al.*, 1995). Erste Informationen bezüglich der AngII-vermittelten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen liegen für OVLT und SFO vor, die als sensorische CVOs der *Lamina terminalis* aufgrund fehlender BHS insbesondere als relevante zentralnervöse Zielstrukturen für AngII in Frage kommen. So konnte in vorangegangenen spektrofluorimetrischen Untersuchungen an Primärzellkulturen des OVLT und SFO eine AngII-vermittelte, calciumabhängige intrazelluläre Signaltransduktion sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten nachgewiesen werden (Gebke *et al.*, 1998). Übereinstimmend mit rezeptorautoradiographischen und elektrophysiologischen Untersuchungen (Bamshad *et al.*, 1999; Rauch and Schmid, 1999) zeigte der experimentelle Einsatz des Rezeptorsubtypspezifischen Antagonisten DUP-753 (AT₁) und PD-123319 (AT₂), dass es sich bei den beteiligten Rezeptoren ausschließlich um AT₁-Rezeptoren handelte (Gebke *et al.*, 1998). Da nach Abnahme der extrazellulären Calciumkonzentration keine AngII- induzierten Calciumsignale registriert werden konnten, wurde angenommen, dass Calcium über Ca²⁺-Kanäle der Zellmembran in die Zelle gelangte (Gebke *et al.*, 1998). Gestützt durch die Untersuchungen an neuronalen Zellen des gesamten neonatalen Rattenhypothalamus (Sumners *et al.*, 1990; Sumners *et al.*, 1996), wurde für Zellen des SFO und OVLT folgender Signaltransduktionsweg postuliert: Bindung von AngII an den AT₁-Rezeptor führt zur G-Protein vermittelten Aktivierung der Adenylatzyklase (Tsutsumi and Saavedra, 1992). Die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A phosphoryliert anschließend

membranintrinsische K^+ -Kanäle, was über eine Hemmung des K^+ - Ausstroms und damit einhergehender Reduktion des Membranpotentials letztlich zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle führt (Sumners *et al.*, 1990; Sumners *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte in der Primärzellkultur des MnPO als einer wichtigen AngII-rezeptiven Struktur der *Lamina terminalis* ebenfalls eine AngII- induzierte Signaltransduktion in Neuronen und Astrozyten demonstriert werden. Während durch *in-situ* Hybridisierungsstudien an Gehirnschnittpräparaten AngII-Rezeptor-spezifische mRNA im Hypothalamus lediglich in GFAP-immunnegativen Zellen (Lenkei *et al.*, 1997) und im Bereich des SFO ebenfalls nur in Neuronen, nicht aber in Gliazellen nachgewiesen wurde (Lippoldt *et al.*, 1993), konnten AngII-Rezeptoren in astrozytären Primärkulturen des Dienzephalons und Kortex fötaler und neonataler Ratten (Bottari *et al.*, 1992), sowie in Astrozyten des *Corpus callosum* bei Mensch und Rind gezeigt werden (Matute *et al.*, 1994). Im Rattenhypothalamus wurden AngII-spezifische Rezeptoren außerdem sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten nachgewiesen (Sumners *et al.*, 1990). In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich die Responsivität der Neurone im Vergleich mit Untersuchungen an Gehirnschnittpräparationen wesentlich reduziert. Während in Extrazelluläableitungen und Patch-clamp-Studien an Gehirnschnittpräparationen 20 bzw. 50 % der getesteten Neurone AngII-responsiv waren (Bai and Renaud, 1998; Travis and Johnson, 1993), zeigten nur 4 % der Neurone ein AngII- induziertes Calciumsignal. Dies könnte auf eine unspezifische Selektion der überlebenden Neurone, bzw. auf veränderte AngII-Rezeptor Expression der Neurone abhängig vom Kulturmedium oder durch Astrozyten und Fibroblasten freigesetzte Autacoide zurückzuführen sein (Bouscarel *et al.*, 1990; Sumners *et al.*, 1990). Desweiteren demonstrierten Guilhaume & Corrêa (2001), dass Läsionen des SFO die AngII-Bindungsstellen im MnPO um 48 % reduzieren. Da sich Primärkulturzellen nicht mehr in ihren natürlichen Zellverband befinden, wäre dies ebenfalls eine Erklärung für die reduzierte Expression des AT1-Rezeptors. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass neben einer calciumabhängigen Signaltransduktion auch andere Mechanismen an der Signalumwandlung des AngII-Signals beteiligt sein können. In hypothalamischen Kulturen neonatalen Gewebes zeigte sich im Vergleich zu fötalen Primärkulturen ein Rückgang des prozentualen Anteils

Rezeptor exprimierender Astrozyten (Bottari, 1992). Als mögliche Funktion glialer AT₁-Rezeptoren wird eine Beteiligung an neuronalen Differenzierungsvorgängen diskutiert, da AngII in Astrozytenkulturen eine erhöhte Sekretion des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1 (PAI-1) und eines den Gewebe-Metalloprotease-Inhibitoren verwandten Proteins auslöste (Olson *et al.*, 1991). Für PAI-1 wurde eine Beteiligung am Neuritenwachstum von Neuroblastomzellen gezeigt. Desweiteren wurde an C6-Gliomazellen der Ratte und humanen Astrozytoma-Zelllinien nach Aktivierung des AT₁-Rezeptors eine Stimulation der Synthese der Prostaglandine E₂ und I₂ beobachtet, die auf einer IP₃- induzierten Erhöhung des intrazellulären Calciums beruhte (Jaiswal *et al.*, 1991). AngII könnte in Astrozyten möglicherweise auch vermehrte Zellteilung induzieren, wie für verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten und Zellen der Nebennierenrinde und der glatten Gefäßmuskulatur bereits nachgewiesen wurde (Saavedra and Chevillard, 1982). Darüber hinaus könnten gliale AngII-Rezeptoren eine Rolle bei der Feedback-Kontrolle von AngII-Biosyntheseschritten spielen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Astrozyten die Angiotensinogen synthetisieren, auch AngII-Rezeptoren exprimieren (Intebi *et al.*, 1990). In der vorliegenden Untersuchung konnte durch AngII keine calciumabhängige Signaltransduktion in Astrozyten ausgelöst werden. Um eine weitere Charakterisierung AngII-responsiver Neurone in der Primärzellkultur des MnPO zu erreichen, erfolgte der immunocytochemische Nachweis der nNOS in Kombination mit MAP. Auffällig ist, dass alle AngII responsiven Neurone nNOS exprimierten. Dies ist sogar auf zellulärer Ebene ein weiterer Hinweis auf die Interaktion des nitrergen und angiotensinergen Systems (Alm *et al.*, 1997; Calapai *et al.*, 1998; Guilhaume and Correa, 2001).

4.4.3. Noradrenalin-induzierte Calciumsignale

Der Nachweis funktioneller Adrenozeptoren durch spektrofluorimetrische Calciummessungen in der vorliegenden Arbeit legt eine modulatorische, noradrenerge Aktivität in Neuronen und Astrozyten des MnPO nah. Verglichen mit den klar definierten, durch zentrales AngII vermittelten Effekten, ist die genaue Bedeutung von NA für die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes, sowie der Kreislaufregulation noch umstritten. Die

Funktionen von NA stehen dabei in engem Zusammenhang mit denen von AngII, da die Aktivierung adrenerger Rezeptorsubtypen an der Vermittlung bzw. Hemmung der AngII- induzierten Trinkwasseraufnahme beteiligt ist. Neben der Modulation der AVP-Freisetzung aus PVN und SON (Benetos *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1985; Willoughby *et al.*, 1987) wird auch eine Beteiligung von NA an der Fieberentstehung auf der Ebene der präoptischen Region diskutiert (Sehic *et al.*, 1996). Sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten der Primärzellkultur des MnPO induzierte NA eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Verglichen mit elektrophysiologischen Untersuchungen am SFO und MnPO in frisch präparierten Gehirnschnitten adulter Ratten (Anthes, 1997; Bai and Renaud, 1998) und Pekingenten (Schmid *et al.*, 1995) erwies sich der Prozentsatz an NA-responsiven Neuronen in der Primärzellkultur des MnPO als wesentlich geringer. So zeigten Patch-clamp-Studien, dass im MnPO der Ratte 59 % der getesteten Neurone sensitiv gegenüber NA waren (Bai and Renaud, 1998), während in der vorliegenden Arbeit 25,6 % der Neurone und 67,8 % der Astrozyten mit einem Calciumsignal antworteten. Abgesehen von speziesabhängigen Unterschieden und der Tatsache, dass in dieser Studie ausschließlich eine calciumabhängige Signaltransduktion untersucht wurde, könnte die altersabhängige Expression adrenerger Rezeptoren für diese Unterschiede verantwortlich sein. Bei fünf bis sechs Tage alten Ratten, die für die Primärkultur verwendet wurden, sind nur 20-30% der im Gehirn adulter Tiere exprimierten α - Adrenozeptoren nachweisbar (Morris *et al.*, 1980), während β - Adrenozeptoren während der ersten Woche nach der Geburt zumindest im cerebralen Kortex kaum nachweisbar sind (Harden *et al.*, 1977). In wie weit die Ontogenese adrenerger Rezeptoren *in vivo* und *in vitro* übereinstimmt ist unklar, da eine veränderte Rezeptorexpression in der Primärzellkultur in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. So wurde einerseits in Studien von Shao und McCarthy (1993) (Shao and McCarthy, 1993) an astroglialen Kulturen des Kortex von einem Tag alten Ratten demonstriert, dass der Prozentsatz an Zellen, die nach NA-Applikation ein Calciumsignal zeigten, sich innerhalb von drei Wochen *in vitro* nicht änderte, während andererseits Nilsson *et al.* (1991) (Nilsson *et al.*, 1991) eine Zunahme der NA-induzierten Calciumantworten in länger kultivierten kortikalen Astrozyten beschrieben.

4.4.4. Antworttypen der AngII-, NA- bzw. PHE-induzierten Calciumsignale bei Neuronen und Astrozyten

An frischen Präparationen wurden transiente Calciumsignale in Bergmanngliazellen und Purkinje Neuronen der Maus (Kirschuk, 1996), sowie in Astrozyten und Oligodendrozyten des Nervus opticus der Ratte (Kriegler und Chiu, 1993) durch adrenerge Liganden ausgelöst. Diese Signale gleichen den in Neuronen und Astrozyten der MnPO-Primärkultur gemessenen transienten Calciumantworten in ihrem raschen Anstieg, dem ein ebenso schneller Rückgang auf Basalwerte der intrazellulären Calciumkonzentration folgt. Im Gegensatz zu frischen Präparationen antworten Astrozyten in Primärzellkulturen des zerebralen Kortex ähnlich wie Zellen des MnPO nicht nur mit transienten, sondern auch plateaubildenden oder oszillierenden Calciumsignalen (Nilsson *et al.*, 1991; Shao und McCarthy, 1993), was auf eine unterschiedliche Responsivität in akuten und Langzeitpräparationen hindeuten könnte. Während bei frisch präpariertem Gewebe evtl. mechanische Belastungen eine Rolle spielen, können sich Zellen in der Kultur regenerieren. Die Applikation von AngII, NA und PHE induzierte bei Neuronen in über 50 % der Fälle ein spike-förmige Signale des Typs B und C. Auffällig erscheinen die unterschiedlichen Antworttypen nach Applikation von NA und PHE. Während NA hauptsächlich Antwortmuster des Typs B induziert, führt die Stimulation mit PHE zu Calciumsignalen des Typs C. Dies ist mittels der Rezeptoraffinität der applizierten Substanzen zu erklären. Während NA neben α_1 - auch an α_2 - und β -Rezeptoren bindet, handelt es sich bei PHE um einen α_1 -spezifischen Agonisten. So handelt es sich bei dem PHE-induzierten Calciumsignal um eine α_1 -vermittelte Signaltransduktion, während eine NA-vermittelte intrazelluläre Calciumerhöhung meist aus kombinierter Signaltransduktion mehrerer Rezeptorsubtypen aufgrund von funktioneller Coexpression resultiert. Im Antwortmuster responsiver Astrozyten findet sich überwiegend der biphasische Antworttyp A. Aus den Mustern der beobachteten Calciumantworten lassen sich Rückschlüsse auf die mobilisierten Calciumspeicher ziehen. Entsprechend dem Antwortmuster A in der vorliegenden Studie wurden in verschiedenen Zelltypen wie etwa kortikalen Astrozyten, Gonadotrophen oder Neutrophilen und nach

unterschiedlichen Stimuli biphasische Calciumsignale mit anfänglicher spikeförmiger Erhöhung und anschließender Abnahme des intrazellulären Calcium auf ein Plateau oberhalb des Basalwerts registriert (Stojilkovic *et al.*, 1990). Die Plateauphase wurde dabei in allen untersuchten Zellen durch Einstrom extrazellulären Calciums ausgelöst, während für die anfängliche spikeförmige Komponente in den Zellen der Niere eine Calciumfreisetzung aus IP₃-sensitiven Speichern verantwortlich war (Iwase *et al.*, 1998). Ein analoger Mechanismus für den NA-induzierten Anstieg des Calciumspiegels in den in dieser Studie untersuchten Primärzellen liegt daher nahe. Untersuchungen im eigenen Hause mit Ca-freien Medium bestätigten diese Vermutungen. Unter Ca-freien Bedingungen der extrazellulären Flüssigkeit konnte bei Astrozyten durch NA lediglich der anfängliche spike-förmige Anstieg des intrazellulären Calciums beobachtet werden, während die Plateauphase gänzlich ausblieb (Ott *et al.* 2005, unpublished).

4.4.5. Immunzytochemische Charakterisierung NA- und AngII-responsiver Neurone

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von NA und Ang II als wichtigste Neurotransmitter der Osmo-, Volumen und Thermoregulation, eine calciumabhängige Signaltransduktion in Neuronen der MnPO-Primärkultur auslösen. Durch immunzytochemische Charakterisierung sollte eine evtl. Zugehörigkeit zum nitrergen System abgeklärt werden. Alle Ang II-responsiven Neurone exprimierten nNOS, während dies bei 12 % der NA-responsiven Neurone zu beobachten war. Insgesamt zwei Neurone exprimierten nNOS und waren sowohl Ang II als auch NA-responsiv. Zusätzlich zu diesen Beobachtungen zeigten sich Unterschiede der Zellmorphologie innerhalb der nitrergen Neurone. Ang II-responsive Neurone wiesen eine bipolare Morphologie auf, NA-responsive Neurone zeigten einen multipolaren Zelltyp. Dies lässt mehrere Thesen zu: 1. Innerhalb des MnPO scheinen unterschiedliche Populationen nitrerger Neurone zu existieren, die eine interagiert mit dem nitrergen, die andere mit dem noradrenergen System. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation osmotischer Abweichungen durch Ang II hauptsächlich über NO vermittelt, während die

Hypovolämie-induzierte Ausschüttung von NA lediglich einen kleinen Teil nitrerger Neurone aktiviert. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen am Gehirnschnitt, war es im Rahmen dieser Untersuchung möglich, Kollokalisierungen des α_1 -adrenergen Rezeptorsubtyps und der nNOS im vMnPO nachzuweisen. Somit erklärt sich die prozentual geringere Aktivierung nitrerger Neurone nach Induktion einer isotonen intravasalen Hypovolämie im Vergleich zur Dehydrierung im Ganztiersversuch dieser Studie. 2. Aufgrund ähnlicher Lokalisation der Fos-Signale in den Substrukturen des MnPO nach Hypovolämie und Dehydrierung ließ sich anhand der Ganztiersversuche vermuten, dass es sich bei den barosensitiven und osmosensitiven Neuronen um eine einheitliche Neuronenpopulation handelt. Elektrophysiologische Studien von Aradachi *et al.* (1996) (Aradachi *et al.*, 1996) ergaben, dass MnPO-intrinsische Neurone mit Afferenzen zum NTS sowohl sensitiv gegenüber hämodynamischen Änderungen als auch Aberrationen der Plasmaosmolalität zu sein scheinen. Somit postulierten sie, dass Blutdruck/ -volumenregulation und Osmoregulation nicht von unterschiedlichen, sondern einer einheitlichen integrativen Neuronenpopulation kontrolliert wird. Nach den spektrofluorimetrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich lediglich ein ganz geringer Anteil potentiell integrative Neurone, die sowohl auf NA als auch Ang II mit einer Erhöhung des intrazellulären Calcium reagierten. Anhand der hier gewonnenen Ergebnisse scheint es sich prinzipiell um unterschiedliche Neuronenpopulationen zu handeln. Stocker & Toney (2005) zeigten, dass es sich bei den gleichzeitig osmo- und barosensitiven Neuronen grundsätzlich um Neurone handelt, die Efferenzen zu pPVN aufweisen. Es besteht somit Grund zur Annahme, dass für die Osmo- und Volumenregulation sowohl singulär- als auch multisensitive Neuronenpopulationen im MnPO existieren (Stocker & Toney, 2005).

Vorangegangene Untersuchungen vermuteten z.B. eine besondere Bedeutung des dMnPO im Rahmen der AngII vermittelten Trinkantwort (Gutman *et al.*, 1989; Lind & Johnson, 1982). Durch Applikation des spezifischen AngII-Antagonisten Saralasin in den dMnPO konnten Tanaka und Nomura (Tanaka *et al.*, 1993) die AngII-vermittelte Trinkantwort unterbinden. Da dies ebenfalls bei Applikation in den vMnPO möglich war vermuteten sie eine Involvierung beider Substrukturen. Andererseits ist eine Applikation in den vMnPO nicht ohne Zellschäden des dMnPO durchführbar, da die Applikationskanüle durch den dMnPO geführt werden muss. Daher ist nur schwer differenzierbar, ob die erzielten Effekte der Saralasin-Behandlung des MnPO auf der Blockade des angiotensinergen Systems des vMnPO, oder der Zellschädigung des dMnPO beruhen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach 24-stündiger Dehydrierung eine signifikante Markierung des dMnPO, was die These der hervorhebenden Bedeutung des dMnPO in Koordination der Ang II-vermittelten Trinkantwort stützt. Zusätzlich zu den Hinweisen, dass die Substrukturen des MnPO wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Osmo- und Thermoregulation übernehmen, ergaben sich im Rahmen dieser Fos-Studie weitere Hinweise auf Subpopulationen innerhalb der MnPO-Substrukturen. Spanswick und Renaud (2005) zeigten, dass Ang II, als wichtigster Vermittler der dehydrierungsbedingten Trinkantwort, lediglich in einer Subpopulation MnPO intrinsischer Neurone eine rhythmische Aktivität auslöst.

Aktivierung hypothalamischer, magnozeller neuroendokriner Zellen (MCNs) (Belin & Moos, 1986; Dyball & Koizumi, 1969; Dyball & Dyer, 1971). Da die MNC Populationen im Hypothalamus weit verbreitet liegen, bedarf es eines Mechanismus der zeitgleichen Aktivierung (Fisher *et al.*, 1979). Vor allem PVN und SON erhalten sowohl kollateralen als auch singulären Input aus Strukturen des Telencephalons und der präoptischen Region. Aus elektrophysiologischen Studien resultierende Daten beschreiben das Vorhandensein kollateraler Inputs zu den MCNs (Caverson & Ciriello, 1989; Renaud *et al.*, 1985). Diese Untersuchungsmethoden sind hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit für diese Fragestellung begrenzt. Zum einen ist die Anzahl der zu beobachtenden Kerngebiete limitiert,

zum anderen ist eine gleichzeitige Erfassung evtl. vorhandener Substrukturen eines Gebietes nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Der in der *Lamina terminalis* des rostralen Hypothalamus gelegene *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO) innerhalb, sowie das *Organum subfornicale* (SFO) bzw. *vasculosum laminae terminalis* (OVLT) außerhalb der Blut-Hirn Schranke spielen eine bedeutende Rolle als sensorische (SFO, OVLT) bzw. sensorisch/integrative (MnPO) neurogiale Einheiten im Rahmen der zentralnervösen Kontrolle des Salz- und Wasser- sowie Wärmehaushalts von Säugetieren wie der Ratte. Einerseits sind Neurone und gliale Zellen von SFO/OVLT für im Blut zirkulierende Ionen und Signalmoleküle wie Hormone frei zugänglich, andererseits stehen beide Einheiten sowie insbesondere auch der MnPO als integrative Komponente des Hypothalamus in ausgeprägter reziprok-neuronaler Verbindung mit zahlreichen Kerngebieten des Hypothalamus, des limbischen Systems oder der *Medulla oblongata*. Neurone des MnPO erhalten dabei neben den osmoregulatorisch relevanten Afferenzen von SFO/OVLT und thermoregulatorisch bedeutsamen Afferenzen aus der präoptischen hypothalamischen Region wichtige Informationen aus der Peripherie nach deren Vorverarbeitung in Kerngebieten der *Medulla oblongata* und *Pons* mit Kreislauf-, Volumen-, osmo- oder thermoregulatorischer Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle des MnPO bzw. seiner Zellen im Rahmen der Perzeption dieser afferenten Signale durch den Einsatz Ganztier-physiologischer, immunhistochemischer und zellbiologischer Techniken zu untersuchen. Dazu wurden männliche Wistar-Ratten folgenden Versuchsbedingungen unterzogen, und deren Auswirkung auf Körperkerntemperatur (KT), lokomotorische Aktivität, Trinkwasseraufnahme und Blutparameter als Maß für Änderungen des intravasalen/extrazellulären Flüssigkeitsraums (EZF) untersucht :

- Gruppe K: Kontrollgruppe (23°C RT; Trinkwasserzugang)
- Gruppe A: Thermische Stimulation (48 h bei 30°C RT; Trinkwasserzugang)
- Gruppe B: Thermische Stimulation (48 h bei 33°C RT; Trinkwasserzugang)
- Gruppe C: Volumen-Stimulation (PEG-Behandlung; kein Trinkwasserzugang)
- Gruppe D: Osmotische Stimulation (23°C RT; 24 h Trinkwasserentzug)

Die transkardiale Fixierung des Gehirngewebes unmittelbar nach Beendigung des Tierversuches sollte dann in coronalen Gehirnschnitten den Stimulus-spezifischen, immunhistochemischen Nachweis einer Translokation des Transkriptionsfaktors Fos in den Kern von Zellen des MnPO sowie OVLT als Parameter einer generellen zellulären Aktivierung ermöglichen. Diese Aktivierung spezifischer Neuronenpopulationen in MnPO (und OVLT) durch extrazelluläre Hypertonizität, Hypovolämie oder erhöhte Umgebungstemperatur führte unmittelbar zur Frage nach den Neurotransmitter-Systemen, welche im Bereich des MnPO an der Verarbeitung der jeweiligen afferenten Signale beteiligt sein könnten. In diesem Zusammenhang wurde dem durch das generierende Enzym neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) gebildeten, volatilen Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) eine bedeutende Rolle bei der Perzeption und Integration thermo-, osmo- sowie Volumen-regulatorischer Signale aufgrund zahlreicher Literaturdaten zugesprochen. Der Nachweis der nNOS erfolgte ebenfalls immunhistochemisch mit Betonung auf einer zellulären Co-Lokalisation mit Fos. Um eine mögliche efferente Projektion aktivierter, (nicht-)nitrerger MnPO-Neurone in die parvozelluläre Komponente des *Nucleus paraventricularis* (pPVN) als wichtigstem, integrativen Kerngebiet des Hypothalamus aufzuzeigen, wurde bei den Tieren mit osmotischer Stimulation (Gruppe D) der retrograd transportierte neuronale Tracer *true blue* (TB) in den pPVN mikroappliziert. Im Hinblick auf die präintegrative Funktion des MnPO als vorgeschaltetem Relais des pPVN sollte in dieser Arbeit also anhand der *in vivo* Versuchsmodelle untersucht werden, ob im Bereich des MnPO freigesetztes NO eine neuromodulatorische Funktion im Rahmen der Homöostase des Wasser-, Elektrolyt- und Wärmehaushaltes einnimmt und aktivierte nitrerger MnPO-Neurone Efferenzen zum pPVN aufweisen.

Osmotische, von Neuronen des SFO und/oder OVLT zum MnPO übertragene Signale bedienen sich *in vivo* in erster Linie des Oktapeptids Angiotensin II (AngII) als wichtigstem Neuromodulator, wie vielfach in der Literatur belegt. Änderungen des EZF-Volumens hingegen werden von peripheren Sensoren im Bereich des Niederdrucksystems polysynaptisch über Strukturen der *Medulla oblongata* an den Hypothalamus, vorrangig den MnPO, übermittelt. Dabei ist

Noradrenalin (NA) als finaler Botenstoff zur Übertragung der medullären Signale an den MnPO hauptverantwortlich.

Um auf zellulärer Ebene die durch hyperosmolale bzw. hypovolämische *in vivo* Stimulation induzierte Aktivierung MnPO-intrinsischer Zellen bezüglich der dabei nachgeschalteten intrazellulären Signaltransduktion untersuchen zu können, wurde eine Primärkultur MnPO-spezifischer Neurone und Gliazellen aus neonatalen Rattengehirnen etabliert. In *in vitro* Experimenten konnte durch Superfusion der mit Fura-2 AM beladenen Zellen der Primärkultur die Stimulus-abhängige, transiente Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) *on-line* erfasst und durch nachfolgende immunzytochemische Charakterisierung Zelltyp-spezifisch zugeordnet werden. Superfundiertes AngII bzw. Noradrenalin (NA) repräsentierten dabei jeweils die Stimulation MnPO-intrinsischer Zellen durch extrazelluläre Hyperosmolalität respektive Hypovolämie.

Bezogen auf die vier Versuchsansätze (A – D) wurden folgende Ganztierphysiologische, immunhistochemische und zellbiologische Ergebnisse erzielt :

- Die milde Wärmeexposition bei Versuchsgruppe A repräsentierte bei unveränderter Plasmaosmolalität und Na^+ -Konzentration sowie nur geringfügiger Reduktion des Plasmavolumens einen nahezu „reinen“ thermischen Stimulus. Während der zweiten Nachtphasen bei 30°C RT ergab sich ein signifikanter Anstieg der KT um 0,3 - 0,4°C sowie der Trinkwasseraufnahme im Vergleich zu den entsprechenden Perioden bei 23°C RT, bei unveränderter lokomotorischer Aktivität. Für alle drei Substrukturen des MnPO sowie ausschließlich die *dorsal cap* des OVLT konnte eine ausgeprägte Aktivierung von Neuronen ermittelt werden, von denen sich lediglich einige in der ventralen Zone des aMnPO als nitrerg erwiesen. Im dMnPO zeigten vor allem nicht-nitrerge Neurone in der lateralen Außenzone, im vMnPO ventrikelnähe, nicht-nitrerge Neurone eine nukleäre Fos-Translokation.
- Die als Hitzestress zu bezeichnende Wärmexposition bei Versuchsgruppe B repräsentierte aufgrund der erhöhten Werte für Hkt sowie Osmolalität und Na^+ -Konzentration des Plasmas einen kombinierten thermischen sowie

hyperosmotischen und hypovolämischen Stimulus. Sowohl die Nachtphasen beider Versuchstage als auch beide Tagphasen des zweiten Tages bei 33°C RT zeigten signifikante Erhöhungen der KT um 0,95 – 1,4°C im Vergleich zu entsprechenden Perioden bei 23°C RT, bei gedämpfter circadianer Rhythmik der KT. Unzureichende Kompensationsversuche spiegelten sich in einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität offensichtlich im direkten Zusammenhang mit vermehrter Trinkwasseraufnahme vorm allem der Tagphasen wider. In allen drei Komponenten des MnPO (vor allem des aMnPO) sowie der *dorsal cap* des OVLT ergab sich eine ausgeprägte Aktivierung von Neuronen, von denen lediglich einige im aMnPO nNOS exprimierten. Die Verteilungsmuster in den Substrukturen des MnPO ähnelten denen bei milder Wärmeexposition.

- Der bei der Versuchgruppe C durch i.p. Applikation von hyperonkotischem PEG hervorgerufene, markante Anstieg des Hkt-Wertes bei unveränderten Werten für Plasmaosmolalität und Na⁺-Konzentration repräsentierte einen „reinen“ Volumenstimulus in Form einer isotonen, intravasalen Hypovolämie, bei unveränderten Daten für KT und lokomotorische Aktivität. Für alle drei Substrukturen des MnPO sowie das zentrale OVLT konnte eine markante neuronale Aktivierung nachgewiesen werden, die jedoch schwächer als bei thermischer Stimulation ausfiel. Dabei konnten für den aMnPO sowie vMnPO Zellen mit nukleärer Fos-Translokation vor allem in deren ventralen Bereichen lokalisiert werden. Im Mittel 6 – 12 % aller aktivierten Neurone des aMnPO, dMnPO und vMnPO sowie 50 % des OVLT erwiesen sich als nitrerg, bzw. 6 – 11 % (MnPO) und 30 % (OVLT) aller nitrergen Zellen wurden durch Hypovolämie aktiviert. Calcium imaging Versuche in der MnPO-Primärkultur ergaben, dass 26 % respektive 68 % aller getesteten MnPO-Neurone respektive -Astrozyten auf Superfusion mit NA als wichtigstem, einen systemischen Volumenstimulus repräsentierenden Neurotransmitter mit einer transienten Erhöhung der [Ca²⁺]_{iz} reagierten. Insgesamt 11 % der aktivierten MnPO-Neurone exprimierten nNOS, in Übereinstimmung mit den *in vivo* ermittelten Daten. Die pharmakologische Charakterisierung des beteiligten Rezeptorsubtyps konnte die funktionelle und immunhistochemische Expression MnPO-intrinsischer α1-Adrenozeptoren demonstrieren.

- Der 24-stündige Entzug des Trinkwassers bei 23°C RT (Versuchsgruppe D) bewirkte einen deutlichen Anstieg der Plasmaosmolalität und -Na⁺-Konzentration, bei marginaler Erhöhung des Hkt-Wertes, und stellte somit einen Stimulus primär des osmoregulatorischen Regelkreises mit partieller Co-Aktivierung der Volumenregulation dar. Bei unveränderter circadianer Rhythmik der KT und der lokomotorischen Aktivität im Verlauf des Dehydratationsversuchs konnten absolute Temperatur- und Aktivitätswerte nahezu identisch mit denjenigen während der Kontrollperioden mit freiem Zugang zu Trinkwasser ermittelt werden. Für alle drei Komponenten des MnPO sowie beide Substrukturen des OVLT ließ sich eine markante neuronale Aktivierung anhand der nukleären Fos-Translokation nachweisen, wobei sich für die Einheiten des MnPO jeweils das Muster einer ubiquitären, zentralisiert homogenen Fos-Markierung ergab. Im Mittel 17 – 26 % aller aktivierten Nervenzellen von aMnPO, dMnPO und vMnPO sowie 24 % des OVLT exprimierten nNOS, bzw. 12 - 26 % (MnPO) und 15 % (OVLT) aller nitrergen Zellen wurden durch extrazelluläre Dehydratation der Versuchstiere stimuliert. Durch neuronal retrograde Tracingstudien konnte gezeigt werden, dass etwa 60 respektive 20 % der durch osmotische Stimulation aktivierten nitrergen Neurone des vMnPO respektive aMnPO/dMnPO efferent zum pPVN projizierten. Bei den *in vitro* Untersuchungen zur induzierten intrazellulären Signaltransduktion konnte AngII als wichtiger, einen systemischen osmotischen Stimulus repräsentierender Neuromodulator in 4 % der MnPO-Neurone eine Erhöhung der [Ca²⁺]_{iz} induzieren, wobei die aktivierten Neurone zu 100 % nNOS exprimierten. Nitrergen Neuronen des vMnPO mit efferenter Verbindung zum pPVN scheint somit eine wichtige Funktion im Rahmen der hypothalamischen Regulation der EZF zu übernehmen.

Summary

In mammals, for instance rats, the *nucleus medianus praeopticus* (MnPO), located within the blood-brain-barrier, and the *organum subfornicale* (SFO) respectively the *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), located outside the blood-brain-barrier, play important parts as sensorial and sensorial/integrative units considering the central-nervous monitoring of salt-, water- and heat balance. On the one hand the neurons and glia cells of the SFO/OVLT are accessible for ions and hormones, which circulate in the blood, on the other hand both units, especially the MnPO, are integrative elements of the hypothalamus and have a distinct, reciprocal-neuronal connection to the hypothalamus, the limbic system and multiple centre zones of the medulla oblongata. Neurons of the MnPO receive in addition to osmoregulatory afferences of the SFO/OVLT, thermoregulatory afferences of the preoptic hypothalamic region, important information from the periphery after they were preprocessed in the centre regions of the medulla oblongata and pons.

The intention of this study was to analyze the relevance of the MnPO, respectively its cells, in the perception of its afferent signals by means of physiological, immunohistochemical and cellbiological techniques. For this reason male Wistar rats were exposed to following test conditions:

- Group K: control group (23°C RT; free access to water)
- Group A: thermal stimulation (48 h at 30°C RT; free access to water)
- Group B: thermal stimulation (48 h at 33°C RT; free access to water)
- Group C: volume stimulation (PEG-treatment; no access to water)
- Group D: osmotic stimulation (23°C RT; 24 h dehydration)

It was measured which effects these test conditions had on body-temperature, locomotive activity, water intake and blood parameters, as a measurement of changes in the extracellular fluid balance.

After the test phase the brain was fixed transcardially and coronal brain sections were made to confirm the existence of the transcription factor Fos within the cells of MnPO as well as OVLT. This shows their activity. The activation of specific neuron populations through hypovolemia and increasing temperature leads to the question of the neurotransmitter systems which are involved. In this context the volatile second messenger nitric oxide (NO), which is generated by the enzyme neuronal nitric-oxide-synthase (nNOS), is mentioned by many authors who give it an important role in the perception and integration of thermal-, osmo-, and volume regulatory signals. The confirmation of nNOS occurred immunohistochemically with emphasis on the cellular co-localization to Fos. To show the efferent pathways of activated MnPO neurons to the *parvocellular nucleus paraventricularis* (pPVN), which is the most important, integrative centre of the hypothalamus, the neuronal tracer true blue was applied to the pPVN, but only in group D. By means of in vivo experimental models, this study tested if the released NO in the MnPO has a neuro-regulatory function regarding the homeostasis of water-, electrolyte- and heat balance.

Osmotic signals which are transmitted by means of SFO and/or OVLT, use the octapeptide Angiotensin as the most important neuromodulator. However changes in the extracellular fluid volume are detected through peripheral sensors in the area of the low pressure system and are transmitted by structures of the medulla oblongata, mainly MnPO. Here noradrenalin (NA), as final second-messenger, is mainly responsible for the transmission of the medullar signals to the MnPO.

To determine the activation of MnPO intrinsic cells due to hypovolemic stimulation and the downstream intracellular signal transduction, a primary culture of MnPO specific neurons and glia cells were established from neonatal rat brains. In in-vitro experiments the excitation dependent transient elevation of

the intracellular calcium-concentration could be detected through superfusion of Fura-2 AM loaded cells of the primary culture and it could be related to specific cells by means of immunohistochemical characterization. Superfused Ang II respectively NA represented the stimulation of MnPO intrinsic cells via extracellular hyperosmolality respectively hypovolemia.

Referring to the four experimental conditions (A-D) following results were found:

- The mild heat exposure in group A represents a pure thermal stimulation, since there were no changes in plasmaosmolality and sodium concentration and just a minor reduction in plasma volume. During the second night phase at 30° C RT a significant increase of body temperature (0,3-0,4° C) and water intake could be seen compared to the group at 23°C RT. No significant increase could be seen in locomotive activity. In all three substructures of the MnPO and exclusive for the dorsal cap of OVLT a pronounced activation of the neurons could be detected. Only some of these in the ventral zone MnPO could be proved as nitrerg. Within the MnPO especially non-nitrerg neurons in the lateral outer zone showed Fos-translocation within the nucleus, whereas within the vMnPO the Fos-translocation was especially detectable in the non-nitrerg neurons nearest the ventricle.
- The higher heat exposure in group B represents a combined thermal, hyperosmotic and hypovolemic stimulation, due to the increased data in HKT, osmolality and sodium concentration of the plasma. Both night phases as well as both day phases on day 2 at 33°C RT showed significant elevations in body temperature (0,95-1,4°C higher compared to 23°C RT) alleviated circadian rhythm of body temperature. Insufficient trials of compensation could be seen in increased locomotive activity combined by an increase in water intake, especially during daytime. All three components of the MnPO (especially the aMnPO) and the dorsal

cap of the OVLT showed a distinct activation of neurons. Only few in aMnPO expressed nNOS. The patterns in the substructures were similar to those at mild heat exposure.

- The i.p application of PEG in group C resulted in a distinct increase in Hkt with stable plasmaosmolality and sodium concentration, which is why this represents pure volume stimulation in terms of an intravascular hypovolemia with unaltered data in body temperature and locomotive activity. In all three substructures of the MnPO plus the central OVLT a distinct increase in neuron activity could be detected, whereas the activity was less than with pure thermal stimulation. 6-12% of the activated neurons in the aMnPO, dMnPO and vMnPO as well as 50% in the OVLT were nitrerg. Respectively 6-11% (MnPO) and 30% (OVLT) of all nitrerg cells were activated by hypovolemia. A calcium imaging test with the MnPO primary culture showed 26% respectively 68% of all tested MnPO neurons reacted to superfused NA with transient increase in sodium concentration. In accordance to the in vivo determined data 11% of the activated MnPO neurons expressed nNOS. The pharmacological characterization of the involved receptors could demonstrate the functional and immunohistochemical concept of MnPO intrinsic α_1 - adrenergic receptor.
- The 24h water withdrawal in group D (23°C RT) caused a distinct increase in plasmaosmolality and sodium concentration with a slight elevation of HKT. Therefore it is primarily an osmoregulatory stimulus with partial co-activation by a volume stimulus. The circadian rhythm of body temperature and the locomotive activity during the water withdrawal were unaltered and the absolute body temperature and locomotive activity were similar to those of the control group. In all three components of the MnPO as well as both components of the OVLT distinct neuronal activity was determined through Fos translocation within the nucleus, whereas the components of the MnPO showed a pattern of ubiquitous, centralized homogeneous FOS markings. 17-26% of all activated neurons in the aMnPO, dMnPO and vMnPO as 24% of the neurons of

the OVLT expressed nNOS. 12-26% (MnPO) and 15 % (OVLT) of all nitroergic cells were stimulated by dehydration. Neuronal, retrograde tracing studies determined 60% respectively 20% of the nitroergic neurons in the vMnPO respectively the aMnPO/dMnPO, which were activated by osmotic stimulation lead to the pPVN. In vitro research into induced, intracellular signal transduction showed AngII, representing a systemic osmotic stimulation, which as an important neuromodulator induced an increase of calcium concentration in 4% of MnPO neurons. The activated neurons expressed to 100% NOS. Nitroergic neurons in the MnPO with efferent pathways to PVN seem to play an important role in hypothalamic regulation of the extracellular fluid balance.

- Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1993) Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10769-10772.
- Adachi A, Nijima A, Jacobs HL (1976) An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. *Am J Physiol* 231:1043-1049.
- Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 25:510-517.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
- Alm P, Skagerberg G, Nylen A, Larsson B, Andersson KE (1997) Nitric oxide synthase and vasopressin in rat circumventricular organs. An immunohistochemical study. *Exp Brain Res* 117:59-66.
- Anderson JW, Washburn DL, Ferguson AV (2000) Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons. *Neuroscience* 100:539-547.
- Andersson B (1978) Regulation of water intake. *Physiol Rev* 58:582.
- Andrews WH, Orbach J (1974) Sodium receptors activating some nerves of perfused rabbit livers. *Am J Physiol* 227:1273-1275.
- Anthes NS, H.A.; Hashimoto, M; Riediger, T.; Simon, E. (1997) Heterogeneous actions of vasopressin on ANG II-sensitive neurons in the subfornical organ of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273:2105-2111.
- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84:169-208.
- Aradachi H, Honda K, Negoro H, Kubota T (1996) Median preoptic neurones projecting to the supraoptic nucleus are sensitive to haemodynamic changes as well as to rise in plasma osmolality in rats. *J Neuroendocrinol* 8:35-43.
- Arbones ML, Ribera J, Agullo L, Baltrons MA, Casanovas A, Riveros-Moreno V, Garcia A (1996) Characteristics of nitric oxide synthase type I of rat cerebellar astrocytes. *Glia* 18:224-232.
- Arnhold MM, Wotus C, Engeland WC (2007) Differential regulation of parvocellular neuronal activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following single vs. repeated episodes of water restriction-induced drinking. *Exp Neurol* 206:126-136.
- Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10089-10093.
- Aschoff J (1990) Annual Rhythm of Human Reproduction: II. Environmental Correlations. *Journal of Biological Rhythms* 5:217-239.
- Ashley CC (1970) An estimate of calcium concentration changes during the contraction of single muscle fibres. *J Physiol* 210:133P-134P.
- Bachtell RK, Tsivkovskaia NO, Ryabinin AE (2003) Identification of temperature-sensitive neural circuits in mice using c-Fos expression mapping. *Brain Res* 960:157-164.

- Badoer E, Oldfield BJ, McKinley MJ (1993) Haemorrhage-induced production of Fos in neurons of the lamina terminalis: role of endogenous angiotensin II. *Neurosci Lett* 159:151-154.
- Badoer E, McKinley MJ, Oldfield BJ, McAllen RM (1992) Distribution of hypothalamic, medullary and lamina terminalis neurons expressing Fos after hemorrhage in conscious rats. *Brain Res* 582:323-328.
- Baertschi AJ, Vallet PG (1981) Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. *J Physiol* 315:217-230.
- Bai D, Renaud LP (1998) ANG II AT1 receptors induce depolarization and inward current in rat median preoptic neurons in vitro. *Am J Physiol* 275:R632-639.
- Bamshad M, Song CK, Bartness TJ (1999) CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276:R1569-1578.
- Barth SW, Gerstberger R (1999) Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. *Brain Res Mol Brain Res* 64:151-164.
- Bastos R, Saad WA, Menani JV, Renzi A, Silveira JE, Camargo LA (1994) Role of adrenergic pathways of the medial preoptic area in ANGII-induced water intake and renal excretion in rats. *Brain Res* 636:81-86.
- Baylor SM, Hollingworth S (2000) Measurement and Interpretation of Cytoplasmic. *News Physiol Sci* 15:19-26.
- Beerb HJCaRD (1997) The brain has a body: adaptive behavior emerges from interactions of nervous system, body and environment. *Trends in Neurosciences* 20:553-557.
- Begg DPK, S.; McKinley, M.J.; Mathai; M.L. (2007) Suppression of endotoxin-induced fever in near-term pregnant rats is mediated by brain nitric oxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:2174-2178.
- Belin V, Moos F (1986) Paired recordings from supraoptic and paraventricular oxytocin cells in suckled rats: recruitment and synchronization. *J Physiol* 377:369-390.
- Bellin SI, Landas SK, Johnson AK (1987) Localized injections of 6-hydroxydopamine into lamina terminalis-associated structures: effects on experimentally induced drinking and pressor responses. *Brain Res* 416:75-83.
- Benarroch EE (2007) Thermoregulation: Recent concepts and remaining questions. *Neurology* 69:1293-1297.
- Benetos A, Gavras I, Gavras H (1986) Norepinephrine applied in the paraventricular hypothalamic nucleus stimulates vasopressin release. *Brain Res* 381:322-326.
- Benham CD, Gunthorpe MJ, Davis JB (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33:479-487.
- Ben-Ishay D, Kobrin I, Saliternick-Vardi R, Feurstein G, Zamir N (1980) The Sabra hypertension prone (H) and hypertension resistant (N) rat strain. *Paroi Arterielle* 6:157-159.
- Betz AL, Iannotti F, Hoff JT (1989) Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:133-154.
- Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW (1995) Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus:

- association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 62:187-197.
- Biegon A, Mathis CA, Budinger TF (1992) Quantitative in vitro and ex vivo autoradiography of the alpha 2-adrenoceptor antagonist [3H]atipamezole. *Eur J Pharmacol* 224:27-38.
- Bisset GW, Chowdrey HS (1988) Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol* 73:811-872.
- Blatteis CM (1981) Hypothalamic substances in the control of body temperature: general characteristics. *Fed Proc* 40:2735-2740.
- Blatteis CMS, E. (1998) Cytokines and Fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* 840:608-618.
- Blume A, Undeutsch C, Zhao Y, Kaschina E, Culman J, Unger T (2005) ANG III induces expression of inducible transcription factors of AP-1 and Krox families in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R845-850.
- Boke T, Malik KU (1983) Enhancement by locally generated angiotensin II of release of the adrenergic transmitter in the isolated rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 226:900-907.
- Bottari SP, Obermuller N, Bogdal Y, Zahs KR, Deschepper CF (1992) Characterization and distribution of angiotensin II binding sites in fetal and neonatal astrocytes from different rat brain regions. *Brain Res* 585:372-376.
- Boulant JA (1981) Hypothalamic mechanisms in thermoregulation. *Fed Proc* 40:2843-2850.
- Boulant JA (1998) Cellular mechanisms of temperature sensitivity in hypothalamic neurons. *Prog Brain Res* 115:3-8.
- Boulant JA (2000) Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. *Clinical Infectious Diseases* 31:157-161.
- Boulant JA (2006) Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol* 100:1347-1354.
- Bourque CW (2002) Stretch-inactivated cation channels: cellular targets for modulation of osmosensitivity in supraoptic nucleus. *Progress in Brain Research* 139:86-90.
- Bourque CW, Ciura S, Trudel E, Stachniak TJ, Sharif-Naeini R (2007) Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones. *Exp Physiol* 92:499-505.
- Bouscarel B, Augert G, Taylor SJ, Exton JH (1990) Alterations in vasopressin and angiotensin II receptors and responses during culture of rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1055:265-272.
- Bouvier M, Leeb-Lundberg LM, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 262:3106-3113.
- Branco LG (1997) Role of the nitric oxide pathway in hypoxia-induced hypothermia of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273:967-971.

- Branco LGB, R.C. (1998) Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation. *J Appl Physiol* 85:967-972.
- Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63:175-195.
- Bredt DSaS, S.H. (1994) Nitric Oxide: A Physiologic Messenger Molecule. *Annual Review of Biochemistry* 63:175-195.
- Brenner D (2002) Primäre Zell- und organotypische Gewebekultur des Rattenhypothalamus: Zellbiologische und cytochemische Charakterisierung angiotensinerner und noradrenerger Signaltransduktionsmechanismen in Strukturen der Lamina terminalis. Dissertation.
- Brody MJJ, A.K. (1980) Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* (Ganony ML, ed), pp 249-292. New York: Raven Press Publishers.
- Brück KHP (1980) Thermoregulatory noradrenergic and serotonergic pathways to hypothalamic units. *J Physiol* 304:193-202.
- Buggy J, Fisher AE (1976) Anteroventral third ventricle site of action for angiotensin induced thirst. *Pharmacol Biochem Behav* 4:651-660.
- Buggy J, Johnson AK (1977) Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hypernatremia. *Am J Physiol* 233:R44-52.
- Buller KM, Smith DW, Day TA (1999) Differential recruitment of hypothalamic neuroendocrine and ventrolateral medulla catecholamine cells by non-hypotensive and hypotensive hemorrhages. *Brain Res* 834:42-54.
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr., Timmermans PB (1991) Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 17:720-721.
- Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D (1992) The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 Suppl 6:S51-62.
- Burgess SKT, P.A.; McCarthy, K.D. (1985) Autoradiographic quantitation of beta-adrenergic receptors on neural cells in primary cultures. II. Comparison of receptors on various types of immunocytochemically identified cells. *Brain Res* 335:11-19.
- Butt E, Geiger J, Jarchau T, Lohmann SM, Walter U (1993) The cGMP-dependent protein kinase--gene, protein, and function. *Neurochem Res* 18:27-42.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46:121-136.
- Calapai G, Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Campo GM, Cilia M, Caputi AP (1992) Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour. *Neuropharmacology* 31:761-764.
- Calapai G, Marciano MC, Costantino G, Russo A, Corica F, Sautebin L, Di Rosa M, Caputi AP (1998) Effects of water deprivation and angiotensin II

- intracerebroventricular administration on brain nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* 360:147-154.
- Calapai GC, A.P. (1996) Nitric oxide and drinking behaviour. *Regulatory Peptides* 66:117-121.
- Calza L, Fuxe K, Agnati LF, Zini I, Ganten D, Lang RE, Poulsen K, Hokfelt T (1982) Presence of renin-like immunoreactivity in oxytocin immunoreactive nerve cells of the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat hypothalamus. *Acta Physiol Scand* 116:313-316.
- Camacho A, Phillips MI (1981) Separation of drinking and pressor responses to central angiotensin by monoamines. *Am J Physiol* 240:R106-113.
- Cannon B, Houstek J, Nedergaard J (1998) Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 856:171-187.
- Card JP, Sved JC, Craig B, Raizada M, Vazquez J, Sved AF (2006) Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol* 499:840-859.
- Carithers J, Johnson AK (1985) Lesions of the tissue surrounding the preoptic recess (AV3V region) affect neurosecretory cells in the paraventricular nuclei in the rat. *Brain Res* 337:233-243.
- Caterina MJ (2007) Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R64-76.
- Caverson MM, Ciriello J (1989) Organization of ventrolateral medullary afferents to the hypothalamus. *Prog Brain Res* 81:281-291.
- Chabrier PE, Demerle-Pallardy C, Auguet M (1999) Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* 55:1029-1035.
- Chan RKWS, P.E. (1995) Hemodynamic regulation of tyrosine hydroxylase messenger RNA in medullary catecholamine neurons: a c-fos-guided hybridization histochemical study. *Neuroscience* 66:377-390.
- Chen XM, Hosono T, Yoda T, Fukuda Y, Kanosue K (1998) Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol* 512 (Pt 3):883-892.
- Chi FL, Jiao Y, Liu HJ, Wang J, Shi Y, Barr JJ (2007) Retrograde neuron tracing with microspheres reveals projection of CGRP-immunolabeled vestibular afferent neurons to the vestibular efferent nucleus in the brainstem of rats. *Neuroendocrinology* 85:131-138.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541-552.
- Ciriello J, Hochstenbach SL, Pastor Solano-Flores L (1996) Changes in NADPH diaphorase activity in forebrain structures of the laminae terminalis after chronic dehydration. *Brain Res* 708:167-172.
- Ciura S, Bourque CW (2006) Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *J Neurosci* 26:9069-9075.
- Coons AH (1958) Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1:399-422.

- Coote JH (1995) Cardiovascular Function of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *Neurosignals* 4:142-149.
- Cork RJ, Perrone ML, Bridges D, Wandell J, Scheiner CA, Mize RR (1998) A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain. *Prog Brain Res* 118:37-50.
- Craig AD, Bushnell MC, Zhang ET, Blomqvist A (1994) A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature* 372:770-773.
- Crompton AW, Taylor CR, Jagger JA (1978) Evolution of homeothermy in mammals. *Nature* 272:333-336.
- Cruz HJ, Dias EM, Moreira JL, Carrondo MJ (1997) Cell-dislodging methods under serum-free conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:482-488.
- Cunningham JT, Johnson AK (1989) Decreased norepinephrine in the ventral lamina terminalis region is associated with angiotensin II drinking response deficits following local 6-hydroxydopamine injections. *Brain Res* 480:65-71.
- Cunningham JT, Beltz T, Johnson RF, Johnson AK (1992) The effects of ibotenate lesions of the median preoptic nucleus on experimentally-induced and circadian drinking behavior in rats. *Brain Res* 580:325-330.
- Cunningham JT, Sullivan MJ, Edwards GL, Farinpour R, Beltz TG, Johnson AK (1991) Dissociation of experimentally induced drinking behavior by ibotenate injection into the median preoptic nucleus. *Brain Res* 554:153-158.
- da Silva RK, Saad WA, Renzi A, Menani JV, Camargo LA (1995) Effect of lateral hypothalamus lesions on the water and salt intake, and sodium and urine excretion induced by activation of the median preoptic nucleus in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 53:195-204.
- Dampney RA, Horiuchi J (2003) Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. *Prog Neurobiol* 71:359-384.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7797-7801.
- Day TA, Sibbald JR (1988) Direct catecholaminergic projection from nucleus tractus solitarii to supraoptic nucleus. *Brain Res* 454:387-392.
- Day TA, Blessing W, Willoughby JO (1980) Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Res* 193:543-548.
- De Gobbi JI, Menani JV, Beltz TG, Johnson RF, Thunhorst RL, Johnson AK (2008) Right atrial stretch alters fore- and hind-brain expression of c-fos and inhibits the rapid onset of salt appetite. *J Physiol* 586:3719-3729.
- De Luca BM, M.; Sullo; A. (1995) Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 568:1533-1538.
- De Paula DSAA, Branco L.G. (2000) The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. *Physiol Behav* 70:505-511.
- de Paula PM, Sato MA, Menani JV, De Luca Junior LA (1996) Effects of central alpha-adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosci Lett* 214:155-158.

- Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF (1986) Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res* 374:195-198.
- DiBona GF (2000) Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 36:1083-1088.
- Dimicco JA, Zaretsky DV (2007) The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R47-63.
- Drößler K, Gerns D (2000) Wörterbuch der Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag.
- du Plessis I, Mitchell D, Niesler C, Laburn HP (2006) c-Fos immunoreactivity in selected brain regions of rats after heat exposure and pyrogen administration. *Brain Res* 1120:124-130.
- Dyball RE, Koizumi K (1969) Electrical activity in the supraoptic and paraventricular nuclei associated with neurohypophysial hormone release. *J Physiol* 201:711-722.
- Dyball RE, Dyer RG (1971) The effect of hypothalamic deafferentation on the firing rates and response to oxytocin of identified paraventricular units in rats. *J Endocrinol* 49:27-28.
- Dzau VJ, Ingelfinger J, Pratt RE, Ellison KE (1986) Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 8:544-548.
- Ebadi M, Sharma SK (2003) Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 5:319-335.
- Edwards GL, Cunningham JT, Beltz TG, Johnson AK (1989) Neuropeptide Y-immunoreactive cells in the caudal medulla project to the median preoptic nucleus. *Neurosci Lett* 105:19-26.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277:38079-38086.
- Eng R, Miselis RR (1981) Polydipsia and abolition of angiotensin-induced drinking after transections of subfornical organ efferent projections in the rat. *Brain Res* 225:200-206.
- Epstein AN, Fitzsimons JT, Rolls BJ (1970) Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *J Physiol* 210:457-474.
- Eriksson S, Hjelmqvist H, Keil R, Gerstberger R (1997) Central application of a nitric oxide donor activates heat defense in the rabbit. *Brain Res* 774:269-273.
- Esplugues JV (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079-1095.
- Feldberg WM, R.D. (1963) A New Concept of Temperature Regulation by Amines in the Hypothalamus. *Nature* 200:1325.
- Feleder C, Perlik V, Blatteis CM (2004) Preoptic alpha 1- and alpha 2-noradrenergic agonists induce, respectively, PGE2-independent and PGE2-dependent hyperthermic responses in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R1156-1166.
- Feleder C, Perlik V, Blatteis CM (2007) Preoptic norepinephrine mediates the febrile response of guinea pigs to lipopolysaccharide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1135-1143.

- Fenelon VS, Poulain DA, Theodosios DT (1993) Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 53:77-89.
- Ferguson AV (1988) Systemic angiotensin acts at the subfornical organ to control the activity of paraventricular nucleus neurons with identified projections to the median eminence. *Neuroendocrinology* 47:489-497.
- Ferguson AV, Bains JS (1997) Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24:96-101.
- Ferrari AC, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, De Luca Junior LA, Menani JV (1990) Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. *Brain Res* 522:125-130.
- Fisher AW, Price PG, Burford GD, Lederis K (1979) A 3-dimensional reconstruction of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. The neurons projecting to the neuro/intermediate lobe and those containing vasopressin and somatostatin. *Cell Tissue Res* 204:343-354.
- Flynn FW, Stricker EM (2003) Hypovolemia stimulates intraoral intake of water and NaCl solution in intact rats but not in chronic decerebrate rats. *Physiol Behav* 80:281-287.
- Frangakis MV, Kimelberg HK (1984) Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 9:1689-1698.
- Frangakis MV, Koopman WJ, Kiyono H, Michalek SM, McGhee JR (1982) An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immunol Methods* 48:33-44.
- Freshney RI (1990) Tierische Zellkulturen - Ein Methoden-Handbuch. Berlin: de Gruyter.
- Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky KP, Boucher R, Genest J (1971) Renin in dog brain. *Am J Physiol* 221:1733-1737.
- Gardiner TW, Verbalis JG, Stricker EM (1985) Impaired secretion of vasopressin and oxytocin in rats after lesions of nucleus medianus. *Am J Physiol* 249:R681-688.
- Garrett WT, McBride RL, Williams JK, Jr., Feringa ER (1991) Fluoro-Gold's toxicity makes it inferior to True Blue for long-term studies of dorsal root ganglion neurons and motoneurons. *Neurosci Lett* 128:137-139.
- Gauer OHK, K.; Jung, R. (1972) Physiologie des Menschen. München: Urban & Fischer.
- Gebke E, Muller AR, Jurzak M, Gerstberger R (1998) Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85:509-520.
- Gebke E, Muller AR, Pehl U, Gerstberger R (2000) Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience* 97:371-381.
- Gehlert DR, Speth RC, Wamsley JK (1985) Quantitative autoradiography of angiotensin II receptors in brain and kidney: focus on cardiovascular implications. *Prog Clin Biol Res* 192:241-249.
- Gerstberger R (1999) Nitric Oxide and Body Temperature Control. *News Physiol Sci* 14:30-36.

- Gerstberger SWB, M. Horowitz, K. Hudl, P. Patronas and T. Hübschle (2001) Differential Activation of Nitrergic Hypothalamic Neurons by Heat Exposure and Dehydration. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation and Pain* (M. Kosaka TS, K.L. Schmidt, E. Simon, ed), pp 43-61. Hong Kong: Springer-Verlag Tokyo.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368.
- Gordon CJ (1987) Relationship between preferred ambient temperature and autonomic thermoregulatory function in rat. *Am J Physiol* 252:R1130-1137.
- Gourine AV (2000) Pharmacological Evidence that Nitric Oxide Can Act as an Endogenous Antipyretic Factor in Endotoxin-induced Fever in Rabbits. *General Pharmacology* 26:835-841.
- Greis AM, J.; Rafalzik, S.; Gerstberger, R.; Hübschle, Th.; Roth, J. (2007) Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:152-161.
- Griffin JD, Kaple ML, Chow AR, Boulant JA (1996) Cellular mechanisms for neuronal thermosensitivity in the rat hypothalamus. *J Physiol* 492 (Pt 1):231-242.
- Grindstaff RJ, Grindstaff RR, Sullivan MJ, Cunningham JT (2000) Role of the locus ceruleus in baroreceptor regulation of supraoptic vasopressin neurons in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R306-319.
- Grob M, Drolet G, Mouginot D (2004) Specific Na⁺ sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 24:3974-3984.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Guilhaume SS, Correa FM (2001) Effect of NMDA-induced lesion of the subfornical organ on the angiotensin II binding sites density and acetylcholinesterase or NADPH-diphorase activities in the lamina terminalis of the rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 21:81-90.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76:126-152.
- Gutman MB, Ciriello J, Mogenson GJ (1988) Effects of plasma angiotensin II and hypernatremia on subfornical organ neurons. *Am J Physiol* 254:R746-754.
- Gutman MB, Jones DL, Ciriello J (1989) Contribution of nucleus medianus to the drinking and pressor responses to angiotensin II acting at subfornical organ. *Brain Res* 488:49-56.
- H. Hensel KB, P. Rath (1973) Homeothermic organism. In: *Temperature and Life* (H. Precht JC, H. Hensel, W. Lercher, ed), pp 503-761. New York: Springer Verlag.

- Haase P, Payne JN (1990) Comparison of the efficiencies of true blue and diamidino yellow as retrograde tracers in the peripheral motor system. *J Neurosci Methods* 35:175-183.
- Hamamura M, Nunez DJ, Leng G, Emson PC, Kiyama H (1992) c-fos may code for a common transcription factor within the hypothalamic neural circuits involved in osmoregulation. *Brain Res* 572:42-51.
- Hammel HT (1965) NEURONES AND TEMPERATURE REGULATION. In: *Physiological Controls and Regulations* (Yamamoto WSB, J.R., ed), pp 71-97. Saunders.
- Hammel HT, Maggert J, Kaul R, Simon-Oppermann C, Simon E (1976) Effects of altering spinal cord temperature on temperature regulation in the Adelie Penguin, *Pygoscelis Adeliae*. *Pflugers Arch* 362:1-6.
- Han L, Rowland NE (1995) Sodium depletion and Fos-immunoreactivity in lamina terminalis. *Neurosci Lett* 193:173-176.
- Harden TK, Wolfe BB, Sporn JR, Poulos BK, Molinoff PB (1977) Effects of 6-hydroxydopamine on the development of the beta adrenergic receptor/adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 203:132-143.
- Harikai N, Tomogane K, Sugawara T, Tashiro S (2003) Differences in hypothalamic Fos expressions between two heat stress conditions in conscious mice. *Brain Res Bull* 61:617-626.
- Harlow E, Lane D (1988) Antibodies - A laboratory manual. In: Cold Spring Harbour Laboratory.
- Hartley DE, Dickson SL, Forsling ML (2004) Plasma vasopressin concentrations and Fos protein expression in the supraoptic nucleus following osmotic stimulation or hypovolaemia in the ovariectomized rat: effect of oestradiol replacement. *J Neuroendocrinol* 16:191-197.
- Hellon RFMD (1975) Convergence in a thermal afferent pathway in the rat. *J Physiol* 248:359-376.
- Hensel HB, K; Rath, P (1973) Homeothermic organism. In: *Temperature and Life* (Precht HC, J; Hensel, H; Larcher W, ed), pp 503-761. New York: Springer Verlag.
- Heppelmann B, Gallar J, Trost B, Schmidt RF, Belmonte C (2001) Three-dimensional reconstruction of scleral cold thermoreceptors of the cat eye. *J Comp Neurol* 441:148-154.
- Herbert J, Forsling ML, Howes SR, Stacey PM, Shiers HM (1992) Regional expression of c-fos antigen in the basal forebrain following intraventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline. *Neuroscience* 51:867-882.
- Hernesniemi J, Kawana E, Bruppacher H, Sandri C (1972) Afferent connections of the subfornical organ and of the supraoptic crest. *Acta Anat (Basel)* 81:321-336.
- Hinman LE, Sammak PJ (1998) Intensity modulation of pseudocolor images. *Biotechniques* 25:124-128.
- Hipolide DC, Tufik S, Raymond R, Nobrega JN (1998) Heterogeneous effects of rapid eye movement sleep deprivation on binding to alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *Neuroscience* 86:977-987.

- Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, Noda M (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci* 5:511-512.
- Hofer H (1958) Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhims der Säugetiere. *Verh Deutsch Zool Ges Frankfurt*.
- Honda K, Negoro H, Higuchi T, Takano S (1990) Activation of supraoptic neurosecretory cells by osmotic stimulation of the median preoptic nucleus. *Neurosci Lett* 119:167-170.
- Horowitz M (1983) Interrelationships between heat acclimation and salivary cooling mechanism in conscious rats. *Comp Biochem Physiol A* 74:945-949.
- Horowitz M, Meiri U (1985) Thermoregulatory activity in the rat: effects of hypohydration, hypovolemia and hypertonicity and their interaction with short-term heat acclimation. *Comp Biochem Physiol A* 82:577-582.
- Horowitz M, Samueloff S (1988) Cardiac output distribution in thermally dehydrated rodents. *Am J Physiol* 254:R109-116.
- Horowitz M, Kaspler P, Simon E, Gerstberger R (1999) Heat acclimation and hypohydration: involvement of central angiotensin II receptors in thermoregulation. *Am J Physiol* 277:R47-55.
- Hubschle T, McKinley MJ, Oldfield BJ (1998) Efferent connections of the lamina terminalis, the preoptic area and the insular cortex to submandibular and sublingual gland of the rat traced with pseudorabies virus. *Brain Res* 806:219-231.
- Hudl K (2003) Tierphysiologische und strukturelle Charakterisierung der hypothalamischen Stickstoffmonoxid- und Angiotensinsysteme als Komponenten der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes: Universität Hohenheim.
- Iadecola C (1995) Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab* 15:378-384.
- Imboden H, Harding JW, Hilgenfeldt U, Celio MR, Felix D (1987) Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res* 410:74-77.
- Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF, Deschepper CF (1990) Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience* 34:545-554.
- Iwai N, Inagami T (1992) Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 298:257-260.
- Iwase K, Iyama K, Akagi K, Yano S, Fukunaga K, Miyamoto E, Mori M, Takiguchi M (1998) Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 53:1-12.
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 3:193-197.
- Jaiswal N, Tallant EA, Diz DI, Khosla MC, Ferrario CM (1991) Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension* 17:1115-1120.
- Janeway CA, Travers P (1997) Immunologie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

- Ji LL, Fleming T, Penny ML, Toney GM, Cunningham JT (2005) Effects of water deprivation and rehydration on c-Fos and FosB staining in the rat supraoptic nucleus and lamina terminalis region. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R311-321.
- Johnson AK (1985) The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res Bull* 15:595-601.
- Johnson AK, Thunhorst RL (1997) The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18:292-353.
- Johnson AK, Zardetto-Smith AM, Edwards GL (1992) Integrative mechanisms and the maintenance of cardiovascular and body fluid homeostasis: the central processing of sensory input derived from the circumventricular organs of the lamina terminalis. *Prog Brain Res* 91:381-393.
- Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL (1996) Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:183-191.
- Johnson Au (2001) *Molecular biology of the cell*: Taylor & Francis Inc.
- Jurzak M, Muller AR, Gerstberger R (1995) Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs. *Neuroscience* 65:1145-1159.
- Jurzak M, Muller AR, Schmid HA, Gerstberger R (1994) Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res* 662:198-208.
- Kadekaro M, Summy-Long JY (2000) Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:450-459.
- Kadekaro M, Terrell ML, Harmann P, Summy-Long JY (1994) Central inhibition of nitric oxide synthase attenuates water intake but does not alter enhanced glucose utilization in the hypothalamo-neurohypophysial system of dehydrated rats. *Neurosci Lett* 173:115-118.
- Kadekaro M, Su G, Chu R, Lei Y, Li J, Fang L (2007) Effects of nitric oxide on expressions of nitrosocysteine and calcium-activated potassium channels in the supraoptic nuclei and neural lobe of dehydrated rats. *Neurosci Lett* 411:117-122.
- Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson PC (1994) Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* 134:1011-1017.
- Kannan H, Koizumi K (1981) Pathways between the nucleus tractus solitarius and neurosecretory neurons of the supraoptic nucleus: electrophysiological studies. *Brain Res* 213:17-28.
- Kanosue K (1986) Thermally induced salivary secretion in anesthetized rats. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 406:351-355.
- Kanosue K (2001) Hypothalamic Region Facilitating Shivering in Rats. *The Japanese Journal of Physiology* 51:625-629.
- Kanosue K, Zhang YH, Yanase-Fujiwara M, Hosono T (1994) Hypothalamic network for thermoregulatory shivering. *Am J Physiol* 267:R275-282.

- Kanosue K, Nakayama T, Tanaka H, Yanase M, Yasuda H (1990) Modes of action of local hypothalamic and skin thermal stimulation on salivary secretion in rats. *J Physiol* 424:459-471.
- Kanosue K YK, Maruyama M, Nagashima K (2001) The Central Organization of the Thermoregulatory System. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain* (Kosaka M ST, Schmidt KL, Simon E, ed): Springer Verlag.
- Kapas L, Fang J, Krueger JM (1994) Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits rat sleep. *Brain Res* 664:189-196.
- Kariya K, Tanaka J, Hori K, Oda M, Iwaki M, Nomura M (1992) Increased monoamine turnover in the subfornical organ area following body fluid depletion. *Neuroreport* 3:901-904.
- Kawano H, Masuko S (1993) Synaptic inputs of neuropeptide Y-immunoreactive noradrenergic nerve terminals to neurons in the nucleus preopticus medianus which project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus of the rat: a combined immunohistochemical and retrograde tracing method. *Brain Res* 600:74-80.
- Kawano H, Masuko S (2000) Beta-endorphin-, adrenocorticotrophic hormone- and neuropeptide y-containing projection fibers from the arcuate hypothalamic nucleus make synaptic contacts on to nucleus preopticus medianus neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *Neuroscience* 98:555-565.
- Kawano H, Masuko S (2006) Peptidergic and catecholaminergic synaptic contacts onto nucleus preopticus medianus neurons projecting to the subfornical organ in the rat. *Neurosci Res* 55:211-217.
- Keil R, Gerstberger R, Simon E (1994) Hypothalamic thermal stimulation modulates vasopressin release in hyperosmotically stimulated rabbits. *Am J Physiol* 267:R1089-1097.
- King MS, Baertschi AJ (1992) Ventral pontine catecholaminergic pathway mediates the vasopressin response to splanchnic osmostimulation in conscious rats. *Brain Res* 580:81-91.
- Kiyohara T (1990) Hypothalamic warm-sensitive neurons possess a tetrodotoxin-sensitive sodium channel with a high Q₁₀. *Neurosci Res* 8:48-53.
- Kiyohara T, Miyata S, Nakamura T, Shido O, Nakashima T, Shibata M (1995) Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res Bull* 38:193-201.
- Kluger MJ (1991) Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiological Reviews* 71:93-127.
- Kobashi M, Adachi A (1985) Convergence of hepatic osmoreceptive inputs on sodium-responsive units within the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol* 54:212-219.
- Kolaj M, Renaud LP (2001) Norepinephrine acts via alpha(2) adrenergic receptors to suppress N-type calcium channels in dissociated rat median preoptic nucleus neurons. *Neuropharmacology* 41:472-479.
- Kolaj M, Renaud LP (2007) Presynaptic alpha-adrenoceptors in median preoptic nucleus modulate inhibitory neurotransmission from subfornical organ and organum vasculosum lamina terminalis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1907-1915.

- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kregel KC, Stauss H, Unger T (1994) Modulation of autonomic nervous system adjustments to heat stress by central ANG II receptor antagonism. *Am J Physiol* 266:R1985-1991.
- Kriegler S, Chiu SY (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J Neurosci* 13:4229-4245.
- Krizanova O, Kiss A, Zacikova L, Jezova D (2001) Nitric oxide synthase mRNA levels correlate with gene expression of angiotensin II type-1 but not type-2 receptors, renin or angiotensin converting enzyme in selected brain areas. *Physiol Res* 50:473-480.
- Krukoff TL (1999) Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev* 30:52-65.
- Krukoff TL, Khalili P (1997) Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 377:509-519.
- Krukoff TL, MacTavish D, Harris KH, Jhamandas JH (1995) Changes in blood volume and pressure induce c-fos expression in brainstem neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 34:99-108.
- Kuypers HG, Bentivoglio M, van der Kooy D, Catsman-Berrevoets CE (1979) Retrograde transport of bisbenzimidazole and propidium iodide through axons to their parent cell bodies. *Neurosci Lett* 12:1-7.
- Lammers Nu (2003) Zelluläre Signalprozesse. In: *Lehrbuch Vorklinik* (Unsicker, ed), pp 421-450. Köln: Ärzte-Verlag.
- Lancaster JR, Jr. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8137-8141.
- Landgraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis K, Pittman QJ (1990) Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol* 258:R155-159.
- Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de Pommery J, Menetrey D (1994) Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-Fos and other immediate early gene proteins. *Neuroscience* 58:287-298.
- LaVail JH, LaVail MM (1972) Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 176:1416-1417.
- Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T, Seifert K, Bravo R, Unger T (1995) Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neuroscience* 65:93-99.
- Lee MA, Cai L, Hubner N, Lee YA, Lindpaintner K (1997) Tissue- and development-specific expression of multiple alternatively spliced transcripts of rat neuronal nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 100:1507-1512.
- Leibowitz SF, Brown LL (1980) Histochemical and pharmacological analysis of catecholaminergic projections to the perifornical hypothalamus in relation to feeding inhibition. *Brain Res* 201:315-345.

- Leite LH, Lacerda AC, Marubayashi U, Coimbra CC (2006) Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R603-607.
- Lenkei Z, Corvol P, Llorens-Cortes C (1995) The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Brain Res Mol Brain Res* 30:53-60.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C (1997) Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18:383-439.
- Leonhardt H, Schulz L, Zuther-Witzsch H (1975) [The ventricular surface of the area postrema and the adjacent area subpostrema in the rabbit brain]. *Z Mikrosk Anat Forsch* 89:264-284.
- Liddell E, Weeks I (1996) Immunolocalisation. In: *Antikörpertechniken* (Weeks I, ed). Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525-535.
- Lin JHL, M.T. (1996) Nitric oxide synthase-cyclo-oxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis: possible role in pyrogenic fever in rabbits. *Br J Pharmacol* 118:179-185.
- Lind RW, Johnson AK (1981) Periventricular preoptic-hypothalamic lesions: effects on isoproterenol-induced thirst. *Pharmacol Biochem Behav* 15:563-565.
- Lind RW, Johnson AK (1982) Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. *J Neurosci* 2:1043-1051.
- Lind RW, Johnson AK (1983) A further characterization of the effects of AV3V lesions on ingestive behavior. *Am J Physiol* 245:R83-90.
- Lind RW, Swanson LW, Sawchenko PE (1985) Anatomical evidence that neural circuits related to the subfornical organ contain angiotensin II. *Brain Res Bull* 15:79-82.
- Lind RWT, R.L.; Johnson, A.K. (1984) The subfornical organ and the integration of multiple factors in thirst. *Physiology & Behavior* 32:69-74.
- Lindvall OB, A. (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl* 412:1-48.
- Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, Ganten D (1995) The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens* 17:251-266.
- Lippoldt A, Bunnemann B, Iwai N, Metzger R, Inagami T, Fuxe K, Ganten D (1993) Cellular localization of angiotensin type 1 receptor and angiotensinogen mRNAs in the subfornical organ of the rat brain. *Neurosci Lett* 150:153-158.

- Liu H, Terrell ML, Bui V, Summy-Long JY, Kadekaro M (1998) Nitric oxide control of drinking, vasopressin and oxytocin release and blood pressure in dehydrated rats. *Physiol Behav* 63:763-769.
- Ljungdahl A, Hokfelt T, Goldstein M, Park D (1975) Retrograde peroxidase tracing of neurons combined with transmitter histochemistry. *Brain Res* 84:313-319.
- Loewy AD, McKellar S (1980) The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed Proc* 39:2495-2503.
- Lutsky I, Aizer F, Mor N (1984) The Sabra rat: definition of a laboratory animal. *Isr J Med Sci* 20:603-612.
- Mallick BN, Jha SK, Islam F (2002) Presence of alpha-1 adrenoreceptors on thermosensitive neurons in the medial preoptico-anterior hypothalamic area in rats. *Neuropharmacology* 42:697-705.
- Mangiapane ML, Thrasher TN, Keil LC, Simpson JB, Ganong WF (1983) Deficits in drinking and vasopressin secretion after lesions of the nucleus medianus. *Neuroendocrinology* 37:73-77.
- Mangiapane ML, Thrasher TN, Keil LC, Simpson JB, Ganong WF (1984) Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res Bull* 13:43-47.
- Mann JF, Eisele S, Rettig R, Unger T, Johnson AK, Ganten D, Ritz E (1988) Renin-dependent water intake in hypovolemia. *Pflugers Arch* 412:574-578.
- Maqbool A (1995) Co-localization of neurotransmitter immunoreactivities in putative nitric oxide synthesizing neurones of the cat brain stem. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 8:191-206.
- Mathai ML, Hubschle T, McKinley MJ (2000) Central angiotensin receptor blockade impairs thermolytic and dipsogenic responses to heat exposure in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1821-1826.
- Matute C, Pulakat L, Rio C, Valcarcel C, Miledi R (1994) Properties of angiotensin II receptors in glial cells from the adult corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3774-3778.
- May CN, McAllen RM (1997) Brain angiotensinergic pathways mediate renal nerve inhibition by central hypertonic NaCl in conscious sheep. *Am J Physiol* 272:R593-600.
- Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Bohme E (1991) Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett* 288:187-191.
- McAllen RM, Pennington GL, McKinley MJ (1990) Osmoresponsive units in sheep median preoptic nucleus. *Am J Physiol* 259:R593-600.
- McKemy D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.
- McKemy DD (2007) Temperature sensing across species. *Pflugers Arch* 454:777-791.
- McKinley MJ, Johnson AK (2004) The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci* 19:1-6.
- McKinley MJ, Denton DA, Weisinger RS (1978) Sensors for antidiuresis and thirst--osmoreceptors or CSF sodium detectors? *Brain Res* 141:89-103.
- McKinley MJ, Hards DK, Oldfield BJ (1994) Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. *Brain Res* 653:305-314.

- McKinley MJ, Badoer E, Vivas L, Oldfield BJ (1995) Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. *Brain Res Bull* 37:131-137.
- McKinley MJ, Allen AM, Clevers J, Paxinos G, Mendelsohn FA (1987) Angiotensin receptor binding in human hypothalamus: autoradiographic localization. *Brain Res* 420:375-379.
- McKinley MJ, Mathai ML, Pennington G, Rundgren M, Vivas L (1999a) Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am J Physiol* 276:R673-683.
- McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H (1999b) The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci* 6:289-301.
- McKinley MJ, McAllen RM, Pennington GL, Smardencas A, Weisinger RS, Oldfield BJ (1996) Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 3:S99-104.
- McKinley MJ, Bicknell RJ, Hards D, McAllen RM, Vivas L, Weisinger RS, Oldfield BJ (1992) Efferent neural pathways of the lamina terminalis subserving osmoregulation. *Prog Brain Res* 91:395-402.
- McKinley MJ, Congiu M, Denton DA, Park RG, Penschow J, Simpson JB, Tarjan E, Weisinger RS, Wright RD (1984) The anterior wall of the third cerebral ventricle and homeostatic responses to dehydration. *J Physiol (Paris)* 79:421-427.
- McKinley MJ, Mathai ML, McAllen RM, McClear RC, Miselis RR, Pennington GL, Vivas L, Wade JD, Oldfield BJ (2004) Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J Neuroendocrinol* 16:340-347.
- McKittrick DJ (2000) Expression of fos in the hypothalamus of rats exposed to warm and cold temperatures. *Brain Res Bull* 53:307-315.
- Mendelsohn FA (1984) Localization of angiotensin converting enzyme in rat forebrain and other tissues by in vitro autoradiography using ¹²⁵I-labelled MK351A. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11:431-435.
- Mentlein R, Roos T (1996) Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells. *Peptides* 17:709-720.
- Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G, Catt KJ (1991) Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11440-11444.
- Miselis RR (1981) The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res* 230:1-23.
- Miyakubo H, Yamamoto K, Hatakenaka S, Hayashi Y, Tanaka J (2003) Drinking decreases the noradrenaline release in the median preoptic area caused by hypovolemia in the rat. *Behav Brain Res* 145:1-5.
- Moga; M.M. & Saper CB (2004) Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 346:137-150.
- Moreton RB (1994) Optical methods for imaging ionic activities. *Scanning Microsc Suppl* 8:371-390.

- Morgan JI, Curran T (1989) Calcium and proto-oncogene involvement in the immediate-early response in the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 568:283-290.
- Morgan JIC, D.R.; Hempstead, J.L.; Curran, T. (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-197.
- Morgan SJ, Darling DC (1994) *Kultur tierischer Zellen*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Morien A, Garrard L, Rowland NE (1999) Expression of Fos immunoreactivity in rat brain during dehydration: effect of duration and timing of water deprivation. *Brain Res* 816:1-7.
- Morimoto T, Itoh T, Takamata A (1998) Thermoregulation and body fluid in hot environment. *Prog Brain Res* 115:499-508.
- Morley JE, Flood JF (1992) Competitive antagonism of nitric oxide synthetase causes weight loss in mice. *Life Sci* 51:1285-1289.
- Morris MJ, Dausse JP, Devynck MA, Meyer P (1980) Ontogeny of alpha 1 and alpha 2-adrenoceptors in rat brain. *Brain Res* 190:268-271.
- Morrison SF (2004) Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol Sci* 19:67-74.
- Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ (2008) Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93:773-797.
- Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M (2003) From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 179:123-135.
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93:829-838.
- Muratani H, Teruya H, Sesoko S, Takishita S, Fukiyama K (1996) Brain angiotensin and circulatory control. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:458-464.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236.
- Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K (2000) Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* 85:18-25.
- Nakamura K, Morrison SF (2008) A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* 11:62-71.
- Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1396-1402.
- Niiijima A (1969) Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. *Science* 166:1519-1520.
- Nilsson M, Hansson E, Ronnback L (1991) Adrenergic and 5-HT₂ receptors on the same astroglial cell. A microspectrofluorimetric study on cytosolic Ca²⁺ responses in single cells in primary culture. *Brain Res Dev Brain Res* 63:33-41.
- Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH (1993) Possible origins and distribution of immunoreactive

- nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:70-79.
- O'Shea RDG, A.L. (2003) Food or Water Deprivation Modulate Nitric Oxide Synthase (NOS) Activity and Gene Expression in Rat Hypothalamic Neurons: Correlation with Neurosecretory Activity? *Journal of Neuroendocrinology* 8:417-425.
- Okazawa M (2002) Ionic Basis of Cold Receptors Acting as Thermostats. *The Journal of Neuroscience* 22:3994-4001.
- Oldfield BJ, Hards DK, McKinley MJ (1992) Neurons in the median preoptic nucleus of the rat with collateral branches to the subfornical organ and supraoptic nucleus. *Brain Res* 586:86-90.
- Oldfield BJ, Badoer E, Hards DK, McKinley MJ (1994) Fos production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II. *Neuroscience* 60:255-262.
- Olson JA, Jr., Shiverick KT, Ogilvie S, Buhi WC, Raizada MK (1991) Angiotensin II induces secretion of plasminogen activator inhibitor 1 and a tissue metalloprotease inhibitor-related protein from rat brain astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1928-1932.
- O'Neill TP, Brody MJ (1987) Role for the median preoptic nucleus in centrally evoked pressor responses. *Am J Physiol* 252:R1165-1172.
- Ono K, Trautwein W (1991) Potentiation by cyclic GMP of beta-adrenergic effect on Ca²⁺ current in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 443:387-404.
- Ootsuka Y, Blessing WW, McAllen RM (2004) Inhibition of rostral medullary raphe neurons prevents cold-induced activity in sympathetic nerves to rat tail and rabbit ear arteries. *Neurosci Lett* 357:58-62.
- Ota M (1993) Evidence that Nitric Oxide Can Act Centrally to Stimulate Vasopressin Release. *Neuroendocrinology* 57:1993.
- Pastuskovas C, Vivas L (1997) Effect of intravenous captopril on c-fos expression induced by sodium depletion in neurons of the lamina terminalis. *Brain Res Bull* 44:233-236.
- Patapoutian A (2003) ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews Neuroscience* 4:529-539.
- Patronas P, Horowitz M, Simon E, Gerstberger R (1998) Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. *Brain Res* 798:127-139.
- Paxinos G WC (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Peck JWB, E.M. (1975) Localization of thirst and antidiuretic osmoreceptors by intracranial injections in rats. *Am J Physiol* 228:1501-1509.
- Peier A (2002) A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108:705-715.
- Penzlin H (2004) Wahrnehmungen - Konstrukte des Gehirns. In: *Biologie unserer Zeit*, p 343. Weinheim: Wiley-VCH.
- Peterson RP (1966) Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 128:181-190.
- Petrov T, Harris KH, MacTavish D, Krukoff TL, Jhamandas JH (1995) Hypotension induces Fos immunoreactivity in NADPH-diaphorase

- positive neurons in the paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei of the rat. *Neuropharmacology* 34:509-514.
- Phillips MI, Weyhenmeyer J, Felix D, Ganten D, Hoffman WE (1979) Evidence for an endogenous brain renin-angiotensin system. *Fed Proc* 38:2260-2266.
- Pickel VM, Chan J (1995) Use of quantitative ultrastructural immunoperoxidase labeling for analysis of catecholamine neurotoxicity and plasticity. *Neurochem Int* 26:125-134.
- Pierau FK (2001) Temperatursensibilität. In: *Neurowissenschaft* (Dudel J MR, Schmidt RF, ed), pp 315-332: Springer Verlag.
- Plunkett LM, Shigematsu K, Kurihara M, Saavedra JM (1987) Localization of angiotensin II receptors along the anteroventral third ventricle area of the rat brain. *Brain Res* 405:205-212.
- Potts PD, Ludbrook J, Gillman-Gaspari TA, Horiuchi J, Dampney RA (2000) Activation of brain neurons following central hypervolaemia and hypovolaemia: contribution of baroreceptor and non-baroreceptor inputs. *Neuroscience* 95:499-511.
- Quintin L, Gillon JY, Ghignone M, Renaud B, Pujol JF (1987) Baroreflex-linked variations of catecholamine metabolism in the caudal ventrolateral medulla: an in vivo electrochemical study. *Brain Res* 425:319-336.
- R. Gerstberger SWB, M. Horowitz, K. Hudl, P. Patronas and T. Hübschle (2001) Differential Activation of Nitrergic Hypothalamic Neurons by Heat Exposure and Dehydration. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation and Pain* (M. Kosaka TS, K.L. Schmidt, E. Simon, ed), pp 43-61. Hong Kong: Springer-Verlag Tokyo.
- Rainbow TC, Biegon A (1983) Quantitative autoradiography of [3H]prazosin binding sites in rat forebrain. *Neurosci Lett* 40:221-226.
- Raivich G, Behrens A (2006) Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol* 78:347-363.
- Raman ER, Roberts MF, Vanhuyse VJ (1983) Body temperature control of rat tail blood flow. *Am J Physiol* 245:R426-432.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619-647.
- Rauch M, Schmid HA (1999) Functional evidence for subfornical organ-intrinsic conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Physiol* 276:R1630-1638.
- Rauscher FJ, 3rd, Sambucetti LC, Curran T, Distel RJ, Spiegelman BM (1988) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52:471-480.
- Reid IA (1984) Actions of angiotensin II on the brain: mechanisms and physiologic role. *Am J Physiol* 246:F533-543.
- Reis WL, Giusti-Paiva A, Ventura RR, Margatho LO, Gomes DA, Elias LL, Antunes-Rodrigues J (2007) Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. *Exp Physiol* 92:903-911.
- Renaud LP, Bourque CW (1991) Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36:131-169.

- Renaud LP, Ferguson AV, Day TA, Bourque CW, Sgro S (1985) Electrophysiology of the subfornical organ and its hypothalamic connections--an in-vivo study in the rat. *Brain Res Bull* 15:83-86.
- Renaud LPC, J.T.; Nissen, R.; Yang, C.R. (1993) Electrophysiology of central pathways controlling release of neurohypophysial hormones. Focus on the lamina terminalis and diagonal band inputs to the supraoptic nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 689:122-132.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM, Moncada S (1994) Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221.
- Roe MW, Lemasters JJ, Herman B (1990) Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* 11:63-73.
- Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP (2002) Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* 92:2667-2679.
- Ross WN (1989) Changes in intracellular calcium during neuron activity. *Annu Rev Physiol* 51:491-506.
- Roth J, Storr B, Martin D, Voigt K, Zeisberger E (2000) The role of local induction of tumor necrosis factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the development of a febrile response in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* 7:169-176.
- Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, Hübschle T (2006) Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol Clin* 24:421-439, v.
- Roth JdS, G.E.P. (2001) Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34:301-314.
- Roth JE (2000) Hormonelle und neuroendokrine Beeinflussung der Temperaturregulation und des Wasserhaushaltes im Verlauf der thermischen Adaptation des Meerschweinchen. Wettenberg: VVB Lauferweiler Verlag.
- Roth JH, E.-M.; Rummel, C.; Gerstberger, R.; Hübschle, Th. (2004) Signaling the brain in systemic inflammation: Role of sensory circumventricular organs. *Frontiers in Bioscience* 9:290-300.
- Rowe BP, Grove KL, Saylor DL, Speth RC (1990) Angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 186:339-342.
- Rowland NE (1998) Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: insights from use of immediate early gene mapping. *Neurosci Biobehav Rev* 23:49-63.
- Rowland NE, Morien A, Fregly MJ (1996) Losartan inhibition of angiotensin-related drinking and Fos immunoreactivity in hypertensive and hypotensive contexts. *Brain Res* 742:253-259.
- Rowland NE, Li BH, Rozelle AK, Fregly MJ, Garcia M, Smith GC (1994) Localization of changes in immediate early genes in brain in relation to hydromineral balance: intravenous angiotensin II. *Brain Res Bull* 33:427-436.
- Ryu V, Lee JH, Um JW, Yoo SB, Lee J, Chung KC, Jahng JW (2008) Water-deprivation-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in the

- hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *J Neurosci Res* 86:1371-1379.
- Saad WA (1985) Interaction between cholinergic and adrenergic synapses of the rat subfornical organ and the thirst-inducing effect of angiotensin II. *Braz J Med Biol Res* 18:37-46.
- Saavedra JM, Chevallard C (1982) Angiotensin-converting enzyme is present in the subfornical organ and other circumventricular organs of the rat. *Neurosci Lett* 29:123-127.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328-1331.
- Sambucetti LC, Curran T (1986) The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science* 234:1417-1419.
- Sandberg K, Ji H, Clark AJ, Shapira H, Catt KJ (1992) Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J Biol Chem* 267:9455-9458.
- Santana R, de De Castro ESE, Reis de Oliveira I, Fregoneze JB (2007) Effects of acute heat exposure on prosencephalic c-Fos expression in normohydrated, water-deprived and salt-loaded rats. *Brain Res* 1141:133-146.
- Saper CB, Levisohn D (1983) Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res* 288:21-31.
- Saper CB, Reis DJ, Joh T (1983) Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci Lett* 42:285-291.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351:230-233.
- Sato MA, Yada MM, Renzi A, Camargo LA, Saad WA, Menani JV, De Luca Junior LA (1996) Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Braz J Med Biol Res* 29:1663-1666.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1981) A method for tracing biochemically defined pathways in the central nervous system using combined fluorescence retrograde transport and immunohistochemical techniques. *Brain Res* 210:31-51.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218:121-144.
- Sayer RJ, Hubbard JI, Sirett NE (1984) Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to transmitters. *Am J Physiol* 247:R374-379.
- Scammell TE (1996) Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271:333-338.
- Scammell TE, Price KJ, Sagar SM (1993) Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain Res* 618:303-307.

- Schafer K, Braun HA, Rempe L (1991) Discharge pattern analysis suggests existence of a low-threshold calcium channel in cold receptors. *Experientia* 47:47-50.
- Schmid H (1993) Temperature sensitivity of neurons in slices of the rat PO/AH area: effect of bombesin and substance P. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264:449-455.
- Schmid HA, Schafer F, Simon E (1995) Opposite effects of angiotensin II and nitric oxide on neurons in the duck subfornical organ. *Neurosci Lett* 187:149-152.
- Schmidt I, Simon E (1982) Negative and positive feedback of central nervous system temperature in thermoregulation of pigeons. *Am J Physiol* 243:R363-372.
- Schmidt RFuT, G. (2003) *Physiologie des Menschen*. New York: Springer Verlag.
- Sehic E, Ungar AL, Blatteis CM (1996) Interaction between norepinephrine and prostaglandin E2 in the preoptic area of guinea pigs. *Am J Physiol* 271:R528-536.
- Sernia C, Zeng T, Kerr D, Wyse B (1997) Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. *Front Neuroendocrinol* 18:174-208.
- Shao Y, McCarthy KD (1993a) Regulation of astroglial responsiveness to neuroligands in primary culture. *Neuroscience* 55:991-1001.
- Shao Y, McCarthy KD (1993b) Quantitative relationship between alpha 1-adrenergic receptor density and the receptor-mediated calcium response in individual astroglial cells. *Mol Pharmacol* 44:247-254.
- Share L (1980) Interactions between the renin-angiotensin system and vasopressin in the control of extracellular fluid volume. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 4:77-82.
- Sharp PJ (1995) Identification of hypothalamic nuclei involved in osmoregulation using fos immunocytochemistry in the domestic hen (*Gallus domesticus*), Ring dove (*Streptopelia risoria*), Japanese quail (*Coturnix japonica*) and Zebra finch (*Taenopygia guttata*). *Cell Tissue Res* 282:351-361.
- Shen E, Dun SL, Ren C, Dun NJ (1992) Hypovolemia induces Fos-like immunoreactivity in neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J Auton Nerv Syst* 37:227-230.
- Shigematsu K, Saavedra JM, Plunkett LM, Kurihara M, Correa FM (1986) Angiotensin II binding sites in the anteroventral-third ventricle (AV3V) area and related structures of the rat brain. *Neurosci Lett* 67:37-41.
- Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H (1997) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 24:80-87.
- Silva JE (1995) Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5:481-492.
- Silverman AJ, Hoffman DL, Zimmerman EA (1981) The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull* 6:47-61.
- Simon E (1997) *Temperaturregulation*. New York: Springer Verlag.

- Simon E (1998) Nitric oxide as a peripheral and central mediator in temperature regulation. *Amino Acids* 14:87-93.
- Simon E (2000) The enigma of deep-body thermosensory specificity. *Int J Biometeorol* 44:105-120.
- Simon E (2006) Ion channel proteins in neuronal temperature transduction: from inferences to testable theories of deep-body thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R515-517.
- Simon E, Pierau FK, Taylor DC (1986) Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation. *Physiol Rev* 66:235-300.
- Simon E, Schmid HA, Pehl U (1998) Spinal neuronal thermosensitivity in vivo and in vitro in relation to hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Prog Brain Res* 115:25-47.
- Simpson JB, Routtenberg A (1973) Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science* 181:1172-1175.
- Sladek CD, Olschowka JA (1994) Dehydration induces Fos, but not increased vasopressin mRNA in the supraoptic nucleus of aged rats. *Brain Res* 652:207-215.
- Slivka A, Chuttani R, Carr-Locke DL, Kobzik L, Bredt DS, Loscalzo J, Stamler JS (1994) Inhibition of sphincter of Oddi function by the nitric oxide carrier S-nitroso-N-acetylcysteine in rabbits and humans. *J Clin Invest* 94:1792-1798.
- Sly JD, Colvill L, McKinley JM, Oldfield JB (1999) Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. *J Auton Nerv Syst* 77:73-82.
- Smith DW, Sibbald JR, Khanna S, Day TA (1995) Rat vasopressin cell responses to simulated hemorrhage: stimulus-dependent role for A1 noradrenergic neurons. *Am J Physiol* 268:R1336-1342.
- Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA (1992) Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol* 316:467-484.
- Spanswick D, Renaud LP (2005) Angiotensin II induces calcium-dependent rhythmic activity in a subpopulation of rat hypothalamic median preoptic nucleus neurons. *J Neurophysiol* 93:1970-1976.
- Speth RC, Wamsley JK, Gehlert DR, Chernicky CL, Barnes KL, Ferrario CM (1985) Angiotensin II receptor localization in the canine CNS. *Brain Res* 326:137-143.
- Steiner AAC, E.C.; Antunes-Rodrigues, J. (1998) Role of nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypothermia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275:937-941.
- Stocker SD, Toney GM (2005) Median preoptic neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus respond to osmotic, circulating Ang II and baroreceptor input in the rat. *J Physiol* 568:599-615.
- Stocker SD, Toney GM (2007) Vagal afferent input alters the discharge of osmotic and ANG II-responsive median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1131:118-128.
- Stojilkovic SS, Stutzin A, Izumi S, Dufour S, Torsello A, Virmani MA, Rojas E, Catt KJ (1990) Generation and amplification of the cytosolic calcium signal during secretory responses to gonadotropin-releasing hormone. *New Biol* 2:272-283.

- Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR (1988) Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242:1444-1446.
- Stricker EM, Hainsworth FR (1970) Evaporative cooling in the rat: effects of dehydration. *Can J Physiol Pharmacol* 48:18-27.
- Stricker EM, Verbalis JG (1986) Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *Am J Physiol* 250:R267-275.
- Stricker EM, Vagnucci AH, McDonald RH, Jr., Leenen FH (1979) Renin and aldosterone secretions during hypovolemia in rats: relation to NaCl intake. *Am J Physiol* 237:R45-51.
- Stricker EMaH, F.R. (1971) EVAPORATIVE COOLING IN THE RAT: INTERACTION WITH HEAT LOSS FROM THE TAIL. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* 56:231-241.
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2:695-702.
- Stuart DG, Kawamura Y, Hemingway A (1961) Activation and suppression of shivering during septal and hypothalamic stimulation. *Exp Neurol* 4:485-506.
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411:217-230.
- Sugawara AM, Miguel TT, de Oliveira LB, Menani JV, De Luca Junior LA (1999) Noradrenaline and mixed α 2-adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. *Brain Res* 839:227-234.
- Sumners C, Myers LM, Kalberg CJ, Raizada MK (1990) Physiological and pharmacological comparisons of angiotensin II receptors in neuronal and astrocyte glial cultures. *Prog Neurobiol* 34:355-385.
- Sumners C, Zhu M, Gelband CH, Posner P (1996) Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K^+ and Ca^{2+} currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol* 271:C154-163.
- Swaminathan S (1980) Osmoreceptors or sodium receptors: an investigation into ADH release in the rhesus monkey. *J Physiol* 307:71-83.
- Szelenyi ZZ, E.; Brück, K. (1977) A hypothalamic -adrenergic mechanism mediating the thermogenic response to electrical stimulation of the lower brainstem in the guinea pig. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 370:19-23.
- Tanaka J (2002) Alpha-adrenergic control of ANG II-induced drinking in the rat median preoptic nucleus. *Physiol Behav* 77:155-160.
- Tanaka J, Kaba H, Saito H, Seto K (1985) Subfornical organ neurons with efferent projections to the hypothalamic paraventricular nucleus: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res* 346:151-154.
- Tanaka J, Ushigome A, Matsuda M, Saito H (1995) Responses of median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus to osmotic stimulation in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 191:47-50.
- Tanaka J, Nomura M, Kariya K, Nishimura J, Kimura F (1993) Median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are sensitive to blood pressure changes. *Brain Res* 605:338-341.

- Tanaka J, Hayashi Y, Watai T, Hori K, Nomura M (1998) Noradrenaline release in the rat subfornical organ area to blood pressure changes. *Exp Neurol* 152:303-306.
- Tassorelli C, Joseph SA (1995) NADPH-diaphorase activity and Fos expression in brain nuclei following nitroglycerin administration. *Brain Res* 695:37-44.
- Tayeh MA, Marletta MA (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem* 264:19654-19658.
- Thomas AR, Delaville F (1991) The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. In: *Cellular Calcium, A Practical Approach* (Cobbold PH, ed), pp 1-54. Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
- Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR, Jr. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:355-360.
- Thrasher TN (1994) Baroreceptor regulation of vasopressin and renin secretion: low-pressure versus high-pressure receptors. *Front Neuroendocrinol* 15:157-196.
- Thrasher TN, Brown CJ, Keil LC, Ramsay DJ (1980) Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism? *Am J Physiol* 238:R333-339.
- Thunhorst RL (1997) The Neuroendocrinology of Thirst and Salt Appetite: Visceral Sensory Signals and Mechanisms of Central Integration. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18:292-353.
- Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM (1994) Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 4:1438-1447.
- Travis KA, Johnson AK (1993) In vitro sensitivity of median preoptic neurons to angiotensin II, osmotic pressure, and temperature. *Am J Physiol* 264:R1200-1205.
- Tribollet E, Armstrong WE, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ (1985) Extra-hypothalamic afferent inputs to the supraoptic nucleus area of the rat as determined by retrograde and anterograde tracing techniques. *Neuroscience* 15:135-148.
- Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19:2396-2404.
- Tsien RY (1989) Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci* 12:227-253.
- Tsien RY, Poenie M (1986) Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *TIBS* 11:450-455.
- Tsien RY, Rink TJ, Poenie M (1985) Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6:145-157.
- Tsutsumi K, Saavedra JM (1992) Heterogeneity of angiotensin II AT₂ receptors in the rat brain. *Mol Pharmacol* 41:290-297.

- Tsutsumi K, Stromberg C, Viswanathan M, Saavedra JM (1991) Angiotensin-II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology* 129:1075-1082.
- Tucker DC, Saper CB, Ruggiero DA, Reis DJ (1987) Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol* 259:591-603.
- Ueta Y, Yamashita H, Kawata M, Koizumi K (1995) Water deprivation induces regional expression of c-fos protein in the brain of inbred polydipsic mice. *Brain Res* 677:221-228.
- Ueta Y, Levy A, Lightman SL, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Hattori Y, Yamashita H (1998) Hypovolemia upregulates the expression of neuronal nitric oxide synthase gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Brain Res* 790:25-32.
- Unnerstall JR, Kopajtic TA, Kuhar MJ (1984) Distribution of alpha 2 agonist binding sites in the rat and human central nervous system: analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain Res* 319:69-101.
- Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R (2006) Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *Eur J Neurosci* 23:3284-3296.
- Ushigome A, Nomura M, Tanaka J (2004) Modulation of noradrenaline release in the median preoptic area by GABAergic inputs from the organum vasculosum of the lamina terminalis in the rat. *Neurochem Int* 44:139-144.
- Vacher CM (2003) The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *European Journal of Neuroscience* 17:455-466.
- Vallet PG, Baertschi AJ (1982) Spinal afferents for peripheral osmoreceptors in the rat. *Brain Res* 239:271-274.
- Vasilenko V (2000) Interleukin-1 β reduces temperature sensitivity but elevates thermal thresholds in different populations of warm-sensitive hypothalamic neurons in rat brain slices. *Neuroscience Letters* 292:207-270.
- Vellucci SV, Parrott RF (1994) Hyperthermia-associated changes in Fos protein in the median preoptic and other hypothalamic nuclei of the pig following intravenous administration of prostaglandin E2. *Brain Res* 646:165-169.
- Ventura RR, Gomes DA, Reis WL, Elias LL, Castro M, Valenca MM, Carnio EC, Rettori V, McCann SM, Antunes-Rodrigues J (2002) Nitrergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Braz J Med Biol Res* 35:1101-1109.
- Verney EB (1957) Renal excretion of water and salt. *Lancet* 273:1237-1242 cont'd.
- Villar MJ, Ceccatelli S, Ronnqvist M, Hokfelt T (1994) Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res* 644:273-281.

- von Bohlen und Halbach O, Albrecht D (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326:599-616.
- Von Euler C (1961) Physiology and pharmacology of temperature regulation. *Pharmac Rev* 13:361-398.
- Wang Y, Newton DC, Marsden PA (1999) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* 13:21-43.
- Watanabe E, Hiyama TY, Kodama R, Noda M (2002) NaX sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. *Neurosci Lett* 330:109-113.
- Wechselberger M, Wright CL, Bishop GA, Boulant JA (2006) Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R518-529.
- Weekley LB (1992) Renal renin secretion rate and norepinephrine secretion rate in response to centrally administered angiotensin-II: role of the medial basal forebrain. *Clin Exp Hypertens A* 14:923-945.
- Wei CC, Wang ZQ, Arvai AS, Hemann C, Hille R, Getzoff ED, Stuehr DJ (2003) Structure of tetrahydrobiopterin tunes its electron transfer to the heme-dioxy intermediate in nitric oxide synthase. *Biochemistry* 42:1969-1977.
- Weisinger RS, Denton DA, Di Nicolantonio R, Hards DK, McKinley MJ, Oldfield B, Osborne PG (1990) Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. *Brain Res* 526:23-30.
- Weiss ML, Yang QZ, Hatton GI (1989) Magnocellular tuberomammillary nucleus input to the supraoptic nucleus in the rat: anatomical and in vitro electrophysiological investigations. *Neuroscience* 31:299-311.
- Weiss MLH, G.I. (1990) Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. I. Afferents from the subfornical organ and the anteroventral third ventricle region. *Brain Res Bull* 24:231-238.
- Westerhaus MJL, A.D. (1999) Sympathetic-related neurons in the preoptic region of the rat identified by viral transneuronal labeling. *J Comp Neurol* 414:361-378.
- Wilkin LD, Patel KP, Schmid PG, Johnson AK (1987) Increased norepinephrine turnover in the median preoptic nucleus following reduced extracellular fluid volume. *Brain Res* 423:369-372.
- Willoughby JO, Jervois PM, Menadue MF, Blessing WW (1987) Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat. *Neuroendocrinology* 45:219-226.
- Wilson KM, Fregly MJ (1985) Angiotensin II-induced hypothermia in rats. *J Appl Physiol* 58:534-543.
- Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Roth J, Gerstberger R (2008) Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*.
- Wyss JM, Van Groen T, Sripanidkulchai K (1990) Dendritic bundling in layer I of granular retrosplenial cortex: intracellular labeling and selectivity of innervation. *J Comp Neurol* 295:33-42.
- Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:657-662.

- Xu Z, Herbert J (1996) Effects of unilateral or bilateral lesions within the anteroventral third ventricular region on c-fos expression induced by dehydration or angiotensin II in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Brain Res* 713:36-43.
- Yada MM, de Paula PM, Menani JV, de Luca Junior LA (1997) Central alpha-adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. *Pharmacol Biochem Behav* 57:137-143.
- Yamaguchi K, Watanabe K, Yamaya K (2000a) Evaluation for roles of nitric oxide generated in the anteroventral third ventricular region in controlling vasopressin secretion and cardiovascular system of conscious rats. *Eur J Endocrinol* 143:523-533.
- Yamaguchi N, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Hayashi Y, Yoshida M, Satoh S (2000b) Interaction between norepinephrine release and intrarenal angiotensin II formation during renal nerve stimulation in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:831-837.
- Yamova L, Atochin D, Glazova M, Chernigovskaya E, Huang P (2007) Role of neuronal nitric oxide in the regulation of vasopressin expression and release in response to inhibition of catecholamine synthesis and dehydration. *Neurosci Lett* 426:160-165.
- Yang G, Gray TS, Sigmund CD, Cassell MD (1999) The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Res* 817:123-131.
- Yasuda Y, Honda K, Negoro H, Higuchi T, Goto Y, Fukuda S (2000) The contribution of the median preoptic nucleus to renal sympathetic nerve activity increased by intracerebroventricular injection of hypertonic saline in the rat. *Brain Res* 867:107-114.
- Ying Z, Reisman D, Buggy J (1996) AP-1 DNA binding activity induced by hyperosmolality in the rat hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res Mol Brain Res* 39:109-116.
- Yoshida K, Maruyama M, Hosono T, Nagashima K, Fukuda Y, Gerstberger R, Kanosue K (2002) Fos expression induced by warming the preoptic area in rats. *Brain Res* 933:109-117.
- Yoshida K, Nakamura K, Matsumura K, Kanosue K, Konig M, Thiel HJ, Boldogkoi Z, Toth I, Roth J, Gerstberger R, Hubschle T (2003) Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Eur J Neurosci* 18:1848-1860.
- Young WS, 3rd, Kuhar MJ (1980) Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1696-1700.
- Zamir N, Gutman Y, Ben-Ishay D (1978) Hypertension and brain catecholamine distribution in the Hebrew University Sabra, H and N rats. *Clin Sci Mol Med Suppl* 4:105s-107s.
- Zardetto-Smith AM (1990) Organization of peptidergic and catecholaminergic efferents from the nucleus of the solitary tract to the rat amygdala. *Brain Res Bull* 25:875-887.
- Zardetto-Smith AM, Gray TS (1987) A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Neurosci Lett* 80:163-166.

- Zardetto-Smith AM, Johnson AK (1995) Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat. *Neurosci Lett* 199:215-219.
- Zardetto-Smith AM, Thunhorst RL, Cicha MZ, Johnson AK (1993) Afferent signaling and forebrain mechanisms in the behavioral control of extracellular fluid volume. *Ann N Y Acad Sci* 689:161-176.
- Zeisberger E (1987) The roles of monoaminergic neurotransmitters in thermoregulation. *Can J Physiol Pharmacol* 65:1395-1401.
- Zeisberger EB, K. (1971) Central effects of noradrenaline on the control of body temperature in the guinea-pig. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 322:152-166.
- Zhao YuB, J.A. (2005) Temperature effects on neuronal membrane potentials and inward currents in rat hypothalamic tissue slices. *The Journal of Physiology* 564:245-257.
- Zhu B, Herbert J (1997) Angiotensin II interacts with nitric oxide-cyclic GMP pathway in the central control of drinking behaviour: mapping with c-fos and NADPH-diaphorase. *Neuroscience* 79:543-553.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5393-1



9 17 8 3 8 3 5 11 9 5 3 9 3 2 1